

Die Bedeutung von Prostaglandin E₂-Rezeptoren für die
TNF- α -induzierten pro-inflammatorischen / pro-destruktiven
Funktionen von synovialen Fibroblasten aus Patienten mit
rheumatoider Arthritis

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anne Steffens
geboren am 08.11.1981 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Raimund W. Kinne, AG Experimentelle Rheumatologie, Lehrstuhl für Orthopädie, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Peter Oelzner, Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Michael Sittinger, Labor für Tissue Engineering & Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien, Charité, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.2014

I Abkürzungsverzeichnis

AC	engl. "adenylate cyclase" (Adenylatzyklase)
ACR	engl. "American College of Rheumatology"
ACPA	engl. "anti citrullinated peptide/protein antibodies"
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
Anti-CCP	Antikörper gegen citrullinierte cyclische Peptide
Anti-MCV	Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
c	Konzentration
cAMP	cyclisches AMP
CCL2	neue Bezeichnung für MCP-1 (Chemokin)
CD	engl. "cluster of differentiation"
cDNA	engl. "complementary DNA"
COX	Cyclooxygenase
cPGES	cytosolische PGES
cPLA ₂	cytosolische PLA ₂
CrP	C-reaktives Protein
CSF	engl. "colony stimulating factor"
CXCL8	neue Bezeichnung für IL-8 (Chemokin)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDA	2',5'-Dideoxyadenosin
DMARD	engl. "disease-modifying anti-rheumatic drug"
DMEM	engl. "Dulbecco's modified Eagle's Medium"

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-desoxynukleosid 5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	engl. "enzyme immunoassay"
ELISA	engl. "enzyme-linked immunosorbent assay"
ERK	engl. "extracellular-signal regulated kinase"
EULAR	engl. "European League Against Rheumatism"
FACS	engl. "fluorescence-activated cell-sorting"
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FGF	engl. "fibroblast growth factor"
FKS	Fötales Kälberserum
FLIP	engl. "fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein"
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen-CSF
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICAM	engl. "intercellular adhesion molecule"
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6-Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharide

Abkürzungsverzeichnis

mAk	monoklonaler Ak
MAP	engl. "mitogen-activated protein"
MCP	engl. "monocyte chemoattractant protein"
M-CSF	Makrophagen-CSF
MHC	engl. "major histocompatibility complex"
MIP	engl. "macrophage inflammatory protein"
miRNA	engl. "microRNA"
MMP	Matrixmetalloproteinase
mPGES	membran-assoziierte/microsomale PGES
mRNA	engl. "messenger RNA"
MRP	engl. "multidrug resistance protein"
MT-MMP	Membran-Typ MMP
NF	engl. "nuclear factor"
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OA	Osteoarthrose
OD	Optische Dichte
ODF	engl. "osteoclast differentiation factor"
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	engl. "protease activated receptor"
PBS	engl. "phosphate-buffered saline"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	engl. "platelet-derived growth factor"
PE-Puffer	Permeabilisierungspuffer
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGES	PGE-Synthase
PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipase
PLA ₂	Phospholipase A ₂

Abkürzungsverzeichnis

RA	rheumatoide Arthritis
RANKL	engl. "receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand"
rcf	engl. "relative centrifugal force"
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl. "revolutions per minute"
RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkription
RUNX1	engl. "runt-related transcription factor 1"
SDS	engl. "sodium dodecyl sulfate"
SEM	engl. "standard error of the mean"
SFB	synoviale Fibroblasten
SM	Synovialmembran
SUMO	engl. "small ubiquitin-like modifier"
TBS	engl. "tris-buffered saline"
TBS-T	engl. "TBS Tween-20"
TGF	engl. "transforming growth factor"
TIMP	engl. "tissue inhibitor of MMP"
TLR	engl. "toll-like receptor"
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRANCE	engl. "TNF-related activation-induced cytokine"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM	engl. "vascular cell adhesion molecule"
VEGF	engl. "vascular endothelial growth factor"
WST	engl. "water soluble tetrazolium"
WT	Wildtyp

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks (links) und der pathologischen Veränderungen (rechts), die im Verlauf der RA auftreten	17
Abbildung 2	Synoviale Fibroblasten in der RA zeigen einen aktivierten Phänotyp	20
Abbildung 3	PGE ₂ -Biosynthese, Interaktion mit den EP-Rezeptoren und pharmakologische Inhibierungswege	25
Abbildung 4	Arbeitskonzept	35
Abbildung 5	Modulierender Einfluss von PGE ₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6	53
Abbildung 6	Modulierender Einfluss von PGE ₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression und Proteinsekretion von IL-6 bzw. MMP-1	54
Abbildung 7	Modulierender Einfluss von PGE ₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-8, CCL2 und MMP-13	56
Abbildung 8	Induktion der cAMP-Bildung durch TNF- α und PGE ₂ , Hemmung durch NS-398	58
Abbildung 9	Einfluss von TNF- α auf die EP-Rezeptor-Expression in RA-SFB .	59
Abbildung 10	Modulierender Einfluss des EP2-Agonisten Butaprost auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1	61
Abbildung 11	Induktion der cAMP-Bildung durch selektive EP-Agonisten	62
Abbildung 12	Modulierender Einfluss von PGE ₂ und selektiven EP-Rezeptor-Agonisten auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1	63
Abbildung 13	Auswirkungen des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX auf die TNF- α -induzierte und PGE ₂ -modulierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1	64
Abbildung 14	Ergebnisse der Suche mit Pathway Studio®	67
Abbildung 15	Arbeitskonzept	69
Abbildung 16	Modulierender Einfluss von PGE ₂ auf TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6 bzw. MMP-1, original PCR-Gele	92
Abbildung 17	Modulierender Einfluss von PGE ₂ und dem EP2-Agonisten Butaprost auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-13 <i>versus</i> MMP-1, IL-8 und CCL2	93
Abbildung 18	Selektive EP-Agonisten stimulieren die cAMP-Bildung	94

Tabelle 1	ACR-Kriterien der rheumatoiden Arthritis, 1987	15
Tabelle 2	ACR/EULAR-Kriterien der rheumatoiden Arthritis, 2010	16
Tabelle 3	PGE ₂ als anti-inflammatorischer Regulator in der RA	29
Tabelle 4	Matrixmetalloproteinasen und ihre Substrate	32
Tabelle 5	Klinische Charakteristika der RA-Patienten	37
Tabelle 6	In der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper	39
Tabelle 7	Eingesetzte Primersequenzen	43
Tabelle 8	Eingesetzte Primersequenzen, Annealing- und Melting- Temperatur	45
Tabelle 9	Zusammensetzung der Western-Blot Puffer	50
Tabelle 10	Zusammenfassung der mit dem Programm Pscan vorhergesagten Transkriptionsfaktoren	65
Tabelle 11	Details der vorhergesagten Transkriptionsfaktoren	66
Tabelle 12	Mittels Pathway Studio [®] gefundene Transkriptionsfaktoren	95

III Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	3
II	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
III	Inhaltsverzeichnis	9
1	Zusammenfassung	12
2	Einleitung	14
2.1	Die rheumatoide Arthritis (RA)	14
2.1.1	Diagnostik der RA	14
2.2	Die Veränderungen an der Synovialmembran (SM) im Verlauf der RA	17
2.3	Synoviale Fibroblasten (SFB) in der RA	18
2.4	Der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α)	21
2.5	Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	23
2.5.1	PGE ₂ in der RA	27
2.6	Interleukin-6 (IL-6)	29
2.7	Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	31
3	Ziele der Arbeit	35
4	Material und Methoden	37
4.1	Patienten	37
4.2	Gewinnung und Kultur von SFB aus der SM von RA-Patienten	37
4.2.1	Isolierung von Zellen aus der SM	37
4.2.2	Reinigung der SFB mittels Anti-CD14 mAk-gekoppelter Magnetobeads	38
4.2.3	Charakterisierung und Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie	38
4.2.4	Kultur von SFB	40
4.3	Stimulierungen von SFB	40
4.3.1	Stimulierung von SFB für die mRNA Analyse	40
4.3.2	Stimulierung von SFB für die cAMP-Messung	41
4.4	Bestimmung der mRNA-Expression in SFB	41
4.4.1	Isolierung der RNA aus SFB	41
4.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	42
4.4.3	cDNA-Synthese	42
4.4.4	Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43

4.4.4.1	PCR-Bedingungen	43
4.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	44
4.4.6	Densitometrische Auswertung der PCR-Gele	44
4.4.7	Bestimmung der Gen-Expression mittels real-time PCR	44
4.5	Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Überständen	46
4.6	Messung von intrazellulärem cAMP	47
4.6.1	Probenvorbereitung	47
4.6.2	Bestimmung des cAMP mittels EIA cAMP Kits	47
4.6.3	Protein Assay	47
4.7	Messung von PGE ₂ in den Überständen	48
4.7.1	Probenvorbereitung	48
4.7.2	Bestimmung der PGE ₂ -Sekretion mittels EIA Kits	48
4.8	Analyse der EP-Rezeptor-Expression und MMP-1-Konzentration mittels Western-Blot	49
4.9	Identifikation von potenziell relevanten Transkriptionsfaktoren für die Modulation der funktionellen Effekte von TNF- α durch PGE ₂	50
4.10	Statistische Analyse	51
5	Ergebnisse	52
5.1	Modulierender Einfluss von PGE ₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA- Expression von IL-6	52
5.2	Modulierender Einfluss von PGE ₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA- Expression und Proteinsekretion von IL-6 bzw. MMP-1	53
5.3	Modulierender Einfluss von PGE ₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA- Expression von IL-8, CCL2 und MMP-13	55
5.4	Aktivierung der cAMP-abhängigen Signalkaskade durch TNF- α und PGE ₂ , Hemmung durch NS-398	56
5.5	Einfluss von TNF- α auf die EP-Rezeptor-Expression	58
5.6	Modulierender Einfluss des EP2-Agonisten Butaprost auf die TNF- α - induzierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-13 bzw. MMP-1, IL-8 und CCL2	60
5.7	Stimulation der cAMP-Bildung durch selektive EP-Agonisten	61
5.7.1	Modulation der TNF- α -induzierten mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1 durch PGE ₂ und selektive EP-Agonisten	62
5.8	Auswirkungen des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX auf TNF- α - und	

	PGE ₂ -stimulierte RA-SFB	64
5.9	Identifikation von potenziell relevanten Transkriptionsfaktoren für die Modulation der funktionellen Effekte von TNF- α durch PGE ₂	65
6	Diskussion	69
6.1	Induktion pro-inflammatorischer und pro-destruktiver Eigenschaften durch TNF- α	70
6.2	Differenzielle Regulation von IL-6 und MMP-1 in RA-SFB durch PGE ₂ .	71
6.3	Differenzielle Regulation von IL-8, CCL2 und MMP-13 durch PGE ₂	72
6.4	Aktivierung der cAMP-Signalkaskade durch TNF- α und PGE ₂	74
6.5	cAMP-Abhängigkeit der Effekte von PGE ₂ auf die TNF- α -induzierte MMP-1-Expression (aber nicht auf die IL-6-Expression)	74
6.6	Differenzielle Regulation der Expression der EP-Rezeptoren durch TNF- α	76
6.7	Differenzielle Modulation der funktionellen Effekte von TNF- α durch individuelle EP-Rezeptoren	76
7	Schlussfolgerung	80
IV	Literaturverzeichnis	81
V	Anhang	92
	Abbildungen, Tab. 12	
	Lebenslauf	
	Veröffentlichungen	
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung	

1 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Erkrankung von erheblicher gesellschaftlicher und volkswirtschaftlicher Relevanz. Für die zukünftige Erforschung neuer therapeutischer Ansätze ist ein Verständnis der Pathogenese der RA unerlässlich. Die vorliegende Arbeit will dazu einen Beitrag leisten, indem sie die Rolle von Prostaglandin E_2 (PGE_2), der Prostaglandin E_2 - (EP -) Rezeptoren 1-4 und ihrer nachgeschalteten post-Rezeptor Signalwege hinsichtlich der Modulation von pro-inflammatorischen und pro-destruktiven Funktionen untersucht.

Synoviale Fibroblasten (SFB) aus Gelenken von RA-Patienten wurden mittels eines besonderen Reinigungsverfahrens gewonnen und mit $TNF-\alpha$, einem Schlüsselzytokin in der Pathogenese der RA, stimuliert. Um die Rolle von PGE_2 , dem traditionell eine pro-inflammatorische Rolle zugewiesen wird, zu entschlüsseln, wurden die zuvor mit $TNF-\alpha$ -stimulierten RA-SFB entweder mit PGE_2 und/oder mit dem die PGE_2 -Synthese inhibierenden Cyclooxygenase- (COX -) Inhibitor NS-398 inkubiert. Dabei zeigte sich, dass NS-398 die IL-6 mRNA-Expression und Proteinsekretion in $TNF-\alpha$ -stimulierten RA-SFB reduzierte, aber die MMP-1 mRNA-Expression und Proteinsekretion induzierte. Durch die Zugabe von externem PGE_2 wurden die Effekte von NS-398 jeweils wieder aufgehoben.

Auch auf die mRNA-Expression der Zytokine IL-8 und CCL2 (MCP-1) hatte NS-398 einen steigernden Einfluss, während PGE_2 den Effekt wieder aufhob. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA-Expression von MMP-13 durch NS-398 reduziert und der Effekt wurde von PGE_2 weiter verstärkt.

Um die Rolle des post-Rezeptor Signalproteins cAMP weiter zu untersuchen, wurden Zeit-Wirkungsexperimente durchgeführt, die zeigten, dass $TNF-\alpha$ (Maximum nach 6-12 h) und PGE_2 (Maximum nach 15-30 min) zeitabhängig die cAMP-Konzentration induzierten. $TNF-\alpha$ induzierte außerdem zeitabhängig die Bildung und Sekretion von PGE_2 (Maximum nach 24 h) und die Expression des $EP2$ -Rezeptors (Maximum nach 8 h).

Die differenzielle Rolle der einzelnen EP-Rezeptoren wurde mithilfe des EP2-Agonisten Butaprost und spezifischen Agonisten der Firma Ono Pharmaceuticals für die EP-Rezeptoren 1-4 weiter aufgeschlüsselt. Butaprost und die spezifischen Ono Agonisten für EP2, aber auch EP3 und EP4 induzierten die mRNA-Expression von IL-6 ähnlich stark wie PGE₂. Die mRNA-Expression von MMP-1 wurde durch Butaprost sowie dem spezifischen EP2-Agonisten herunterreguliert, und zwar im gleichen Maße wie durch PGE₂.

Schließlich wurde der Einfluss des Signalproteins cAMP bei der Regulation von IL-6 und MMP-1 mithilfe eines den Abbau von cAMP hemmenden Moleküls, des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX, weiter untersucht. Während die mRNA-Expression von IL-6 nach Präinkubation mit IBMX unverändert blieb, zeigte sich eine deutliche Reduktion der MMP-1 mRNA-Expression und damit eine Verstärkung der PGE₂ Wirkung durch IBMX. Dies spricht für eine cAMP-unabhängige Regulation von IL-6 und eine cAMP-abhängige Regulation von MMP-1 durch PGE₂.

Zusammengefasst reguliert PGE₂ die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von pro-inflammatorischem IL-6 und pro-destruktivem MMP-1 differenziell. Dies geschieht einerseits durch eine differenzielle Nutzung der EP-Rezeptoren und andererseits durch cAMP-abhängige und cAMP-unabhängige post-Rezeptor Signalwege. Bisher erschien eine spezifische Blockade des EP2-Rezeptors als ein vielversprechendes Ziel in der Therapie der RA; diese Arbeit zeigt jedoch, dass pro-inflammatorisches IL-6 und pro-destruktives MMP-1 durch PGE₂ über den EP2-Rezeptor gegensätzlich reguliert werden und daher ein komplexerer Ansatz zur Hemmung der COX-1/2-cAMP-Achse zur Therapieoptimierung der RA notwendig sein könnte. Außerdem ist der weitverbreitete und populäre Einsatz von COX-Inhibitoren in der RA aufgrund der hier erstmals in dieser Form vorgelegten Ergebnisse kritisch zu hinterfragen.

2 Einleitung

2.1 Die rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung der Gelenke. Mit einer Prävalenz von 0,5-1% und einer Inzidenz von 5 - 50 pro 100.000 Erwachsene in den Industriestaaten hat sie zusätzlich zu der individuellen Krankheitsbelastung auch eine enorme volkswirtschaftliche Bedeutung (Rooney BK et al. 1999).

Die RA ist durch eine symmetrische synoviale Entzündung gekennzeichnet, die langfristig zu einer Zerstörung von Knorpel und Knochen in den Gelenken führt. Die genaue Ätiologie der RA ist noch immer unbekannt, genetische Ursachen scheinen jedoch eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Prävalenz der RA in monozygoten Zwillingen höher ist als in der restlichen Bevölkerung (Silman AJ et al. 2002). Ferner sind Polymorphismen bestimmter Gene des major histocompatibility complex (MHC), die auf dem Chromosom 6 lokalisiert sind, mit dem Auftreten der RA assoziiert (Gregersen PK et al. 1987). Auch für das Auftreten von Polymorphismen in anderen Genen, wie beispielsweise *PTPN22* und *PADI4*, wurde eine signifikante Assoziation mit der RA gezeigt, zum Teil mit erheblichen ethnischen Differenzen (Plenge RM 2009). Hormonelle Faktoren scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA zu spielen: Frauen sind etwa 2 bis 3-mal häufiger als Männer betroffen; andererseits scheint die Einnahme oraler Kontrazeptiva vor der Entwicklung einer RA zu schützen. Allerdings haben kinderlose Frauen ein höheres Risiko, an einer RA zu erkranken (Silman AJ et al. 2002). Die spezielle Rolle von Östrogenen und Gestagenen ist also momentan noch unklar. Schließlich gibt es auch Hinweise darauf, dass verschiedene Umweltfaktoren (Rauchen, Belastung durch Luftverschmutzung oder Silica-Staub, Infektionen) die Suszeptibilität für die RA oder die Schwere der Erkrankung erhöhen.

2.1.1 Diagnostik der RA

Die Diagnose einer RA wird anhand klinischer und laborchemischer Parameter gestellt. Zu den laborchemischen Parametern zählen die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), das C-reaktive Protein (CrP) sowie der serologische

Nachweis von Antikörpern gegen citrullinierte Proteine (anti-citrullinated protein antibodies, ACPA) und von Rheumafaktoren (RF). Die RF sind jedoch weder sehr spezifisch noch sehr sensitiv für die RA; sie treten beispielsweise auch als paraneoplastisches Zeichen bei Tumorerkrankungen auf. Als klinische Kriterien gelten die Anzahl und Verteilung der schmerzhaften, überwärmten und/oder geschwollenen Gelenke und Symptome wie Morgensteifigkeit, Antriebslosigkeit, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit sowie ein allgemeines Krankheitsgefühl. Bildgebende Verfahren, wie Sonografie, Röntgen und Kernspintomografie, geben Aufschluss über entzündliche Veränderungen der Synovialmembran (SM), Gelenkergüsse oder Erosionen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Patienten in klinischen Studien zu erreichen, wurden von dem American College of Rheumatology (ACR, ehemals American Rheumatism Association, ARA) Klassifikationskriterien für die RA aufgestellt [ACR-Kriterien von 1987, Tab. 1; (Arnett FC et al. 1988)]. Nach den ACR-Kriterien von 1987 müssen 4 von 7 Kriterien für eine Klassifikation als RA-Patient erfüllt sein, wobei die Kriterien 1-4 seit mindestens 6 Wochen bestehen müssen.

Tab. 1: ACR-Kriterien der rheumatoiden Arthritis, 1987

1	Morgensteifigkeit von mindestens 1 Stunde Dauer
2	Weichteilschwellung bzw. Arthritis von 3 oder mehr Gelenken
3	Schwellung bzw. Arthritis der proximalen interphalangealen oder metakarpophalangealen Fingergelenke oder der Handgelenke
4	Symmetrische Schwellung bzw. Arthritis
5	Rheumaknoten
6	Nachweis von Rheumafaktoren
7	Im Röntgenbild Erosionen und/oder gelenknahe Osteoporose in Finger- oder Handgelenken

Symptome 1-4 müssen mindestens 6 Wochen lang vorhanden sein. Für eine sichere rheumatoide Arthritis müssen mindestens 4 Kriterien erfüllt sein.

Ein besonderes Problem stellt die frühe entzündliche Arthritis dar. Die Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1987 zeigen nur eine geringe Sensitivität für die frühe Arthritis. Eine effektive Behandlung gerade in der Frühphase der Erkrankung führt jedoch dazu, dass die Patienten im

weiteren Verlauf die ACR-Kriterien von 1987 nicht (mehr) erfüllen. Mit der Etablierung der Antikörpertests gegen citrullinierte Peptide (Anti-CCP, Anti-cyclic citrullinated protein und Anti-MCV, Anti-mutated citrullinated vimentin) stehen außerdem inzwischen spezifischere Tests zur Frühdiagnose der RA zur Verfügung. Ferner wurden in prospektiven Beobachtungsstudien Merkmale identifiziert, die Vorhersagen über den Schweregrad des Krankheitsverlaufs von Patienten mit früher Arthritis erlauben. Als Ergebnis dieser Entwicklung haben Mitglieder des ACR und der European League Against Rheumatism (EULAR) neue Klassifikationskriterien für die RA aufgestellt (Tab. 2).

Tab. 2: ACR/EULAR-Kriterien der rheumatoiden Arthritis, 2010

-
- 1 Gelenkbeteiligung
 - 1 mittleres / großes Gelenk betroffen (0)
 - 2-10 mittlere / große Gelenke betroffen (1)
 - 1-3 kleine Gelenke betroffen (2)
 - 4-10 kleine Gelenke betroffen (3)
 - Mehr als 10 kleine Gelenke betroffen (5)
 - 2 Serologie
 - Negativer RF und ACPA (0)
 - Positiver RF und/oder ACPA in niedriger Konzentration (<3-faches der Norm) (1)
 - Positiver RF und/oder ACPA in hoher Konzentration (>3-faches der Norm) (3)
 - 3 Dauer der Synovitis
 - < 6 Wochen (0)
 - > 6 Wochen (1)
 - 4 Entzündungsparameter
 - CrP und BSG normal (0)
 - CrP und/oder BSG-Wert erhöht (1)
-

Eine Klassifikation als „definitive RA“ basiert auf dem Vorhandensein einer Synovitis in mindestens einem Gelenk, dem Ausschluss einer anderen Diagnose, welche die Synovitis besser erklären würde, und dem Erreichen eines Scores von ≥ 6 von möglichen 10 Punkten in 4 Domänen.

Mithilfe dieser neuen Klassifikationskriterien sollen Patienten mit früher Synovitis und einem hohen Risiko für einen aggressiven Krankheitsverlauf rechtzeitig identifiziert und damit die Basis für den Beginn einer Therapie mit einem krankheitsmodifizierenden Medikament (sog. DMARD, disease-modifying anti-rheumatic drug)

geschaffen werden. Eine Klassifikation als „definitive RA“ basiert nach den neuen ACR/EULAR-Kriterien der RA von 2010 (Aletaha D et al. 2010) auf dem Vorhandensein einer Synovitis in mindestens einem Gelenk, dem Ausschluss einer anderen Diagnose, welche die Synovitis besser erklären würde, und dem Erreichen eines Scores von ≥ 6 von 10 möglichen Punkten in 4 Domänen. Da die Proben der SM (Synovialmembran) in dieser Arbeit vor der Aufstellung der neuen ACR/EULAR-Kriterien gewonnen wurden, wurden die ACR-Kriterien von 1987 zur Patientenauswahl angewendet.

2.2 Die Veränderungen an der Synovialmembran (SM) im Verlauf der RA

Das Gelenk ist die Verbindung von zwei mit Knorpel bedeckten Knochenenden, die von einer Gelenkkapsel umgeben sind (Abb. 1). Die Gelenkkapsel wird von einer SM ausgekleidet, die normalerweise weniger als 100 μm dick ist. Zum Gelenkspalt hin wird die SM von einer dünnen Schicht von Deckzellen (sog. Deckzellschicht, Dicke 1-3 Zellschichten) ausgekleidet. Diese dünne Deckzellschicht besteht aus sog. Typ-A- (makrophagenartigen) und Typ-B- (fibroblastenartigen) Zellen.

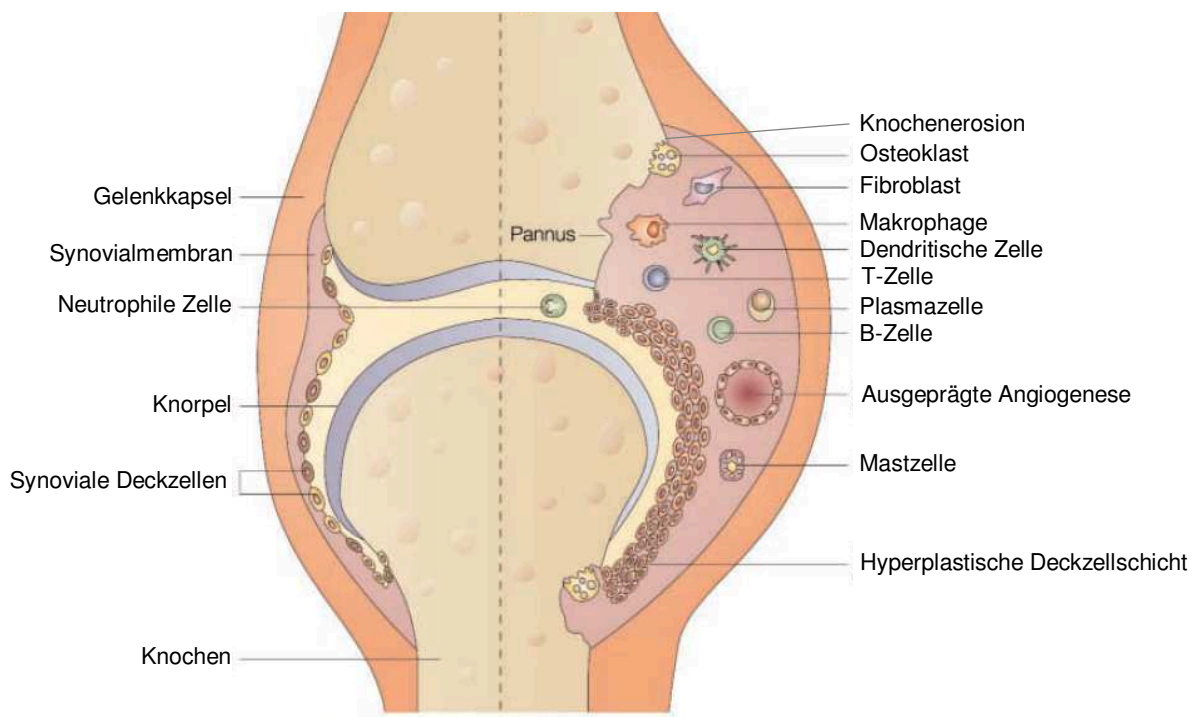


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks (links) und der pathologischen Veränderungen (rechts), die im Verlauf der RA auftreten

Modifiziert nach (Smolen JS et al. 2003)

In der normalen SM sind nur sehr wenige mononukleäre Zellen und nur eine geringe Vaskularisation in dem darunter liegenden Bindegewebe nachweisbar. Dagegen ist das Bindegewebe des entzündlich veränderten Gelenkes eines RA-Patienten stark vaskularisiert; außerdem sind viele mononukleäre Zellen in der SM vorhanden.

Die RA ist durch eine entzündliche Veränderung der SM (sog. Synovitis) gekennzeichnet, die durch Angiogenese und die Einwanderung und/oder Aktivierung von verschiedenen mononukleären Zellen (wie T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen) begleitet wird. Die synoviale Deckzellschicht wird hyperplastisch (> 20 Zellschichten) und die SM verdickt sich und bildet Villi (villöse Hypertrophie). Resultat der „tumorähnlichen“ Hyperplasie der SM ist ein aggressives Gewebe, das als Pannus bezeichnet wird. Es enthält Osteoklasten (Gravallese EM et al. 1998) und ist für die Destruktion von Knorpel, Knochen und umgebenden Weichteilen im Verlauf der RA verantwortlich.

2.3 Synoviale Fibroblasten in der RA

Synoviale Fibroblasten (SFB) erfüllen im gesunden Gelenk eine Vielzahl wichtiger Funktionen. Die SFB der Deckzellschicht produzieren und sezernieren die langkettige, polymere Hyaluronsäure in die Gelenkhöhle. Die Hyaluronsäure hat immunmodulatorische Funktionen und „schmiert“ das Gelenk. Außerdem produzieren die SFB der Deckzellschicht das Glykoprotein Lubricin, das zur Viskosität der Synovialflüssigkeit beiträgt, und den Plasminogen Aktivator, der fibröse Adhäsionen verhindert und die normale Gelenkbeweglichkeit ermöglicht. Weiterhin regulieren die SFB über die Produktion der Hyaluronsäure das Volumen der Synovialflüssigkeit (Mor A et al. 2005). Über die Expression von Oberflächmolekülen, wie z.B. vascular cell adhesion molecule (VCAM-) 1 und intercellular adhesion molecule (ICAM-) 1, regulieren die SFB den Leukozytenstrom zwischen Synovialmembran und Gelenkspalt und steuern somit den Abtransport von Debris (Müller-Ladner U et al. 2001). Schließlich tragen die SFB durch die Produktion von Bindegewebskomponenten, wie Fibronectin, Kollagen Typ IV und VI, Laminin, verschiedenen Chondroitin-Proteoglykanen und Fibrillin, zum Erhalt der Gelenkkapsel bei (Iwanaga T et al. 2000).

Im Verlauf der RA entwickeln die SFB einen sog. aktivierten Phänotyp. SFB in der RA (RA-SFB) teilen sich schneller als SFB aus normalen oder Osteoarthrose (OA)-Gelenken (Mohr W et al. 1975). Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie platelet-derived growth factor (PDGF) und transforming growth factor (TGF-) β , werden von RA-SFB bzw. makrophagenartigen Typ-A-Zellen vermehrt sezerniert und stimulieren die Proliferation der RA-SFB (Pohlers D et al. 2006). Ferner wurden Mutationen in der (die Mitose regulierenden) mitogen-activated protein (MAP) Kinase extracellular-signal regulated kinase (ERK) (Schett G et al. 2000) und in dem Tumorsuppressorgen p53 (Firestein GS et al. 1997) beschrieben. Beide bieten eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Zellteilungsrate in RA-SFB, ohne jedoch eine Aussage bezüglich der Kausalität treffen zu können. So wurde postuliert, dass Mutationen in dem Tumorsuppressorgen p53 eher die Folge von oxidativem und inflammatorischem Stress im Gelenk sind als die ätiologische Ursache der RA (Tak PP et al. 2000). Proto-Onkogene wie die Transkriptionsfaktoren Jun-B und c-Fos werden in RA-SFB vermehrt exprimiert (Kinne RW et al. 1995) und verschiedene anti-apoptotische Moleküle wie sentrin-1/small ubiquitin-like modifier (SUMO-) 1 und Fas-associated death domain-like interleukin 1 beta-converting enzyme-inhibitory protein (FLIP) wurden in RA-SFB nachgewiesen (Baier A et al. 2003). Daneben scheinen epigenetische Veränderungen in den SFB eine wichtige Rolle für die Pathogenese der RA zu spielen (Jüngel A et al. 2010). MicroRNAs (miRNA) sind Modulatoren der Genexpression; die miRNA miR-155 und miR-146a sind beispielsweise in RA-SFB vermehrt exprimiert und regulieren die Expression der Matrixmetalloproteinasen (MMP-) 1 und 3 (Stanczyk J et al. 2008).

RA-SFB produzieren (Hirth A et al. 2002) und reagieren gleichzeitig auf pro-inflammatorische Mediatoren wie Interleukin (IL-) 1, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 21, 33, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF-) α , TGF- β und Interferon (IFN-) γ , Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Prostaglandin E₂ (Hwang SY et al. 2004; Kojima F et al. 2003; Kunisch E et al. 2009). Aktivierte SFB tragen ferner selbst zur Angiogenese bei, indem sie pro-angiogenetische Faktoren wie fibroblast growth factor (FGF-) 2, vascular endothelial growth factor (VEGF) und IL-18 sezernieren (Yamashita A et al. 2002).

Direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen RA-SFB und T-Zellen führt zur T-Zell-Aktivierung und Produktion von Zytokinen durch T-Zellen (Bombara MP et al. 1993). RA-SFB exprimieren außerdem den toll-like receptor (TLR-) 2, dessen Stimulierung zur Aktivierung von nuclear factor (NF-) κ B und zur Produktion von Chemokinen führt (Pierer M et al. 2004). Auf zellulärer Ebene regelt v.a. der Transkriptionsfaktor NF- κ B die Expression von über 70 verschiedenen Genen, die in das Entzündungsgeschehen eingreifen [u.a. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Cyclooxygenase- (COX-) 2, receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)] (Makarov SS 2001).

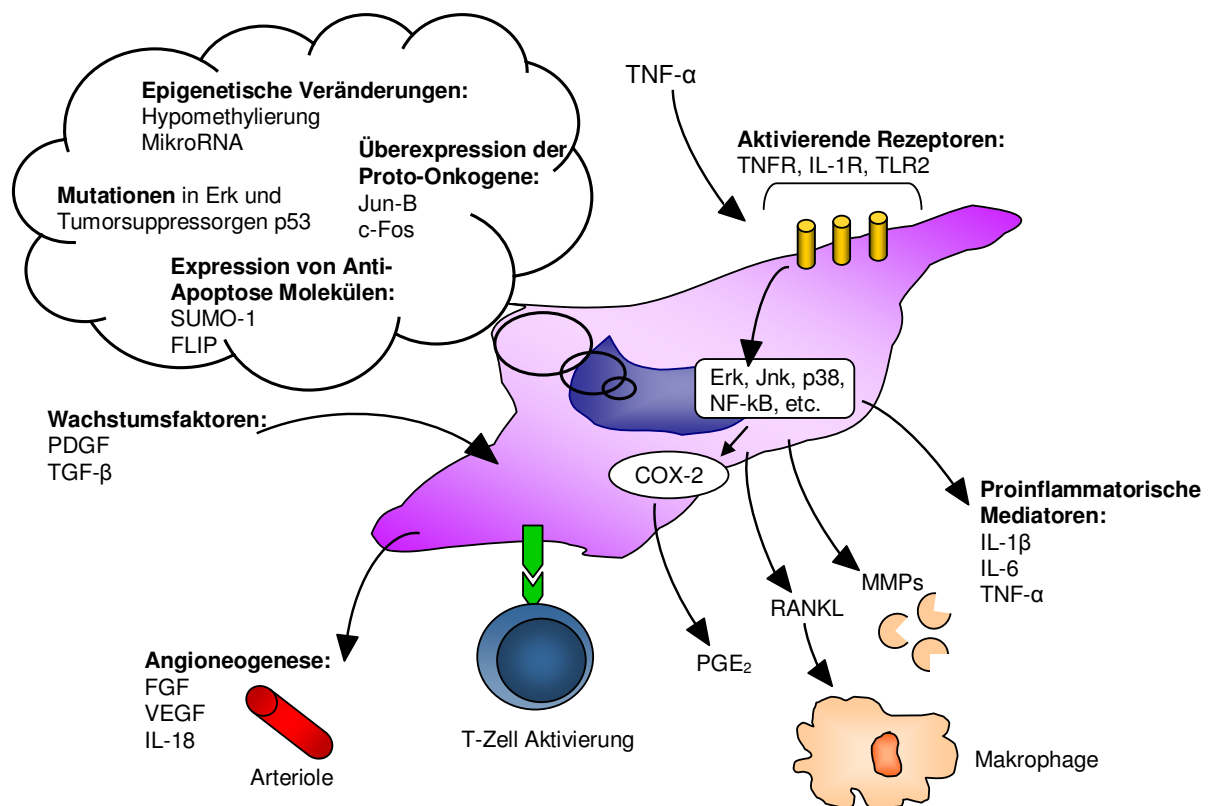


Abbildung 2: Synoviale Fibroblasten in der RA zeigen einen aktivierten Phänotyp

modifiziert nach (Mor A et al. 2005)

Der aktivierte Phänotyp von RA-SFB ist gekennzeichnet durch die erhöhte Expression von Proto-Onkogenen, Anti-Apoptose-Molekülen und Wachstumsfaktoren, Mutationen in Erk und Tumorsuppressorgen sowie epigenetische Veränderungen. RA-SFB reagieren auf Zytokine und andere stimulierende Moleküle mit der Aktivierung von verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionswegen, darunter p38, NF- κ B und die MAP Kinasen Erk bzw. Jnk. Die Aktivierung dieser und anderer Signaltransduktionswege führt zur Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und über die Hochregulation von COX-2 zur verstärkten Produktion von PGE₂. Pro-destruktive MMPs und RANKL werden sezerniert. Direkter Zell-Zell-Kontakt führt zur T-Zell Aktivierung. Verstärkte

Produktion von FGF, VEGF und IL-18 führt zur Angiogenese. Die erhöhte Vaskularisation der Synovialmembran trägt zum schnellen Transport von Leukozyten, Zytokinen und MMPs innerhalb der SM bei.

Die aktivierten RA-SFB sezernieren matrixabbauende Enzyme (Matrixmetalloproteinasen, MMPs) (DiBattista JA et al. 1995) und tragen so zur Zerstörung von Knochen und Knorpel im Gelenk bei. Zusätzlich sezernieren RA-SFB den osteoclast differentiation factor (ODF) (auch bekannt als RANKL oder TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)), der zur Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten und zur Aktivierung der osteoklastischen Aktivität führt (Gravallese EM et al. 2000).

2.4 Der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α)

Mitte der Siebziger Jahre fand man nach Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) im Mausserum einen Faktor, der Nekrosen in Tumoren induziert. Diesen Faktor nannten Carswell et al. Tumor-Nekrose-Faktor (Carswell EA et al. 1975).

TNF- α ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie, die derzeit ca. 20 Proteine umfasst, und nimmt in der Pathogenese der RA eine zentrale Rolle ein. Er wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von B-Zellen, T-Zellen, Fibroblasten u.v.a. produziert (Vassalli P 1992). Neu synthetisierter TNF- α liegt zunächst membrangebunden vor und wird durch enzymatische Abspaltung freigesetzt. Das aktive, lösliche Molekül hat ein Molekulargewicht von 17 kDa und ist aus drei identischen Untereinheiten aufgebaut. TNF- α ist Hauptmediator bei entzündlichen, immunologischen und pathophysiologischen Reaktionen. Die Reaktion der Zielzellen auf TNF- α ist sehr unterschiedlich. Er kann sowohl Apoptose als auch Proliferation induzieren oder eine veränderte Expression einer Vielzahl von Genen, z.B. von Zytokinen und matrixdegradierenden Enzymen (Grell M et al. 1993).

TNF- α entfaltet seine biologische Wirkung über zwei membranständige Rezeptoren, den TNF-Rezeptor I (Molekulargewicht 55 kDa; TNF-RI, p55 oder CD120a) und den TNF-Rezeptor II (Molekulargewicht 75 kDa; TNF-RII, p75 oder CD120b) (Brockhaus M et al. 1990). Beide sind transmembranöse Glykoproteine, die auf nahezu allen Zellen vorkommen. TNF-RI wird dabei konstitutionell exprimiert, während TNF-RII induzierbar ist und hauptsächlich auf Endothelzellen und Zellen des Immunsystems

exprimiert wird. Beide Rezeptoren können von MMPs proteolytisch abgespalten werden und sind dann als lösliche Rezeptoren durch Neutralisierung von freiem TNF- α an der negativen Regulation seiner Bioverfügbarkeit beteiligt. Die Rezeptoren unterscheiden sich außerdem in der Affinität zu ihrem Liganden, in der intrazellulären Struktur und in der Aktivierung von Signaltransduktionswegen (Kunisch E et al. 2007). Aufgrund der verschiedenen intrazellulären Domänen der beiden Rezeptoren führen die jeweiligen Signaltransduktionswege zu unterschiedlichen biologischen Antworten in den Zielzellen (Dembic Z et al. 1990).

Neben der namensgebenden Induktion des Zelltodes sind immunologische und nichtimmunologische Wirkungen von TNF- α zu unterscheiden. Immunologisch ist TNF- α ein stark pro-inflammatorisches Zytokin. Es induziert die Produktion weiterer pro-inflammatorischer (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18), aber auch einiger anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, TGF- β , IL-1RA) sowie von IFN- γ , IL-8 und dem koloniestimulierenden Faktor der Granulozyten/Makrophagenreihe (GM-CSF) (Haworth C et al. 1991). Weiterhin steigert es die Sekretion von Hormonen (Cortisol, Adrenalin, Noradrenalin, Glukagon, Insulin) sowie von Akute-Phase-Proteinen, Leukotrienen und freien Sauerstoffradikalen.

Immunhistologische Analysen in der SM von RA-Patienten zeigen, dass TNF- α hauptsächlich von Makrophagen gebildet wird (Chu CQ et al. 1991). Ferner korreliert das Ausmaß der Knorpel- und Knochendestruktion in den entzündeten Gelenken der RA-Patienten positiv mit dem TNF- α -Spiegel in der Synovialflüssigkeit (Neidel J et al. 1995). Außerdem ist die TNF-Rezeptor-Konzentration im Serum von RA-Patienten erhöht und korreliert positiv mit der Erkrankungsaktivität (Robak T et al. 1998). TNF- α und beide TNF-Rezeptoren lassen sich in immunologischen Untersuchungen der SM von RA-Patienten nachweisen (Alsalameh S et al. 1999). Beide Rezeptoren lassen sich auch auf isolierten RA-SFB nachweisen, wobei TNF-RI auf diesen Zellen stärker exprimiert wird (Butler DM et al. 1994). Die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch synoviale Zellen lässt sich durch Zugabe von monoklonalen Anti-TNF- α -Antikörpern (mAk) hemmen (Butler DM et al. 1995). Transgene Mäuse mit konstitutiver Überexpression von TNF- α entwickeln spontan Arthritiden, während entsprechende Mäuse, denen der TNF-RI

fehlt (TNF-RI k.o. Mäuse), nur eine abgeschwächte Kollagen-induzierte Arthritis entwickeln (Alexopoulou L et al. 1997).

Die Bedeutung von TNF- α wird durch den Erfolg der Therapie mit TNF-Antagonisten (TNF-RII/Fc-IgG-Fusionsprotein Etanercept, Anti-TNF-mAk Infliximab und Adalimumab) bei der Behandlung der RA und anderer Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis unterstrichen. Die TNF-Antagonisten führen – zumindest in ca. 66-70% der behandelten Patienten – zu einer signifikanten klinischen Verbesserung; zusätzlich wurde eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität von RA-Patienten nachgewiesen sowie eine signifikante Verlangsamung des Fortschreitens der Knochendestruktion (Elliott MJ et al. 1994).

2.5 Prostaglandin E₂ (PGE₂)

Prostaglandine sind kurzlebige Lipidmediatoren, die zur Gruppe der Eicosanoide gehören (Funk CD 2001) und deren Synthese am Ende der Arachidonsäurekaskade steht. Schlüsselenzym dieses pathobiochemischen Weges ist die Kalzium (Ca²⁺)-abhängige, zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂), die Arachidonsäure aus den Membran-Phospholipiden freisetzt (Abb. 3A und 3B). Die Aktivierung der PLA₂ erfolgt über verschiedene Stimuli, wie Immunkomplexe, Antigene und pro-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-6 und TNF- α). Die freigesetzte Arachidonsäure wird an der zytosolischen Seite des Zellkerns oder des Endoplasmatischen Retikulums sofort weiter metabolisiert, zunächst durch die COX-1 oder COX-2 in PGH₂ und dann durch zell- und gewebespezifische Prostaglandinsynthasen in verschiedene Prostaglandine wie PGE₂, PGI₂, PGD₂ oder PGF_{2 α} (Park JY et al. 2006).

Es gibt 3 Isoformen der COX. Die konstitutiv exprimierte COX-1 ist für eine basale PG-Synthese verantwortlich, die nach Stimulierung auch hochreguliert werden kann. Sie ist in nahezu allen Geweben nachweisbar (Crofford LJ 1997). Die Isoform COX-2 wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert und ist für die Regulation von Entzündungsprozessen verantwortlich. In der SM von RA-Patienten ist COX-2 vermehrt exprimiert, was durch die Behandlung mit Glukocortikoiden reduziert

werden kann (Sano H et al. 1992). COX-3 ist eine Splice-Variante von COX-1, die v.a. im Gehirn und im Herz vorkommt (Chandrasekharan NV et al. 2002).

PGE₂ wird aus PGH₂ entweder durch die zytosolische PGE-Synthase (cPGES) oder durch die membran-assoziierte/microsomale PGE-Synthase- (mPGES-) 1 oder 2 synthetisiert. cPGES wird konstitutiv exprimiert und wandelt das von COX-1 gebildete PGH₂ in PGE₂ um (Abb. 3A), während mPGES-1 durch Zytokine induziert wird und an COX-2 bindet (Abb. 3B). Auch die konstitutiv exprimierte mPGES-2 kann in pathologischen Prozessen (z.B. in Tumorzellen) hochreguliert werden und interagiert mit beiden COX-Enzymen (Park JY et al. 2006).

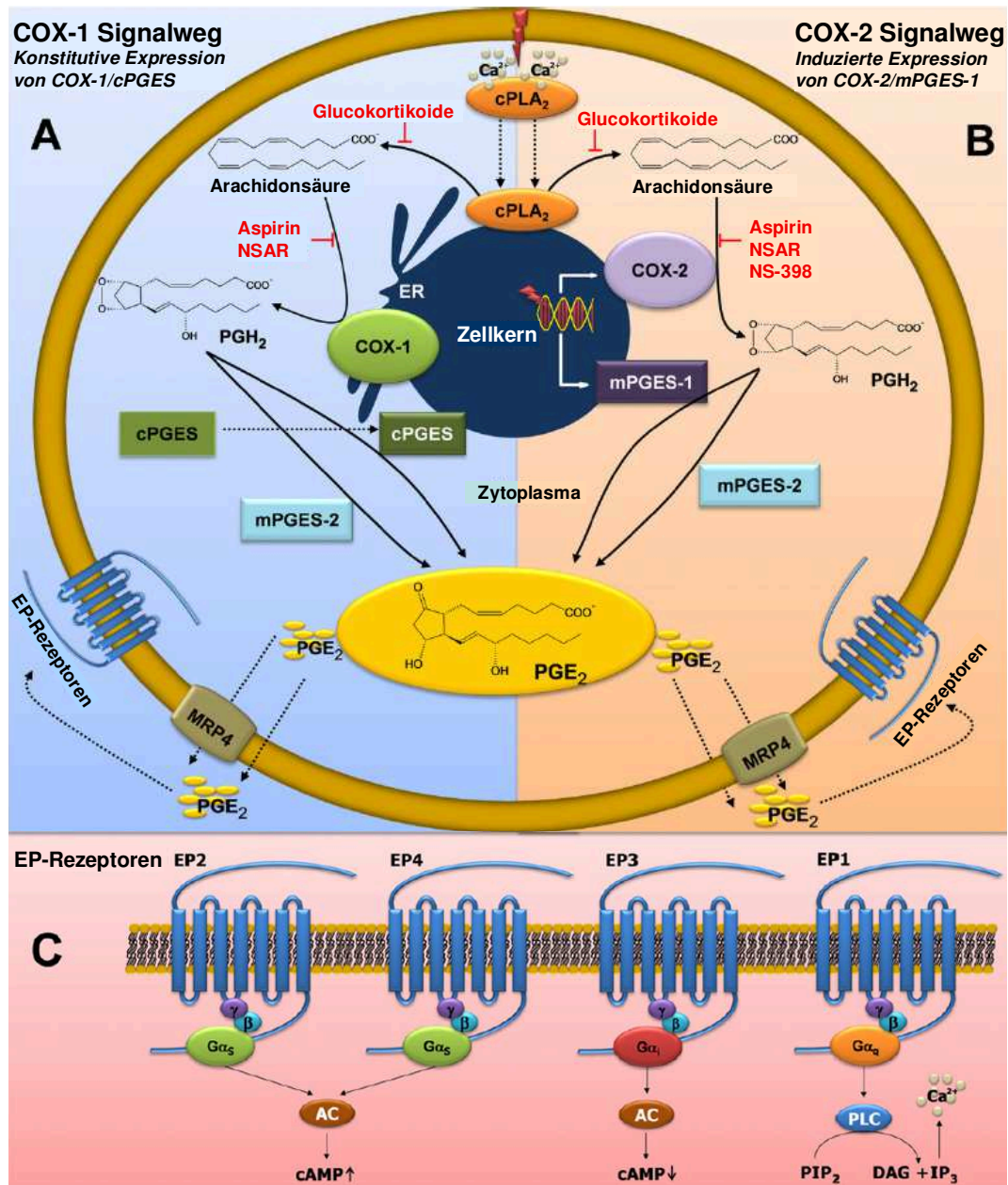


Abbildung 3: PGE₂-Biosynthese, Interaktion mit den EP-Rezeptoren und pharmakologische Inhibierungswege

modifiziert nach (Legler DF et al. 2010)

Die Ca²⁺-abhängige PLA₂ setzt Arachidonsäure aus Membran-Phospholipiden frei. A: Die Arachidonsäure wird durch die konstitutiv exprimierte COX-1 und cPGES über PGH₂ zu PGE₂ metabolisiert. B: Während einer Entzündungsreaktion metabolisiert die durch Zytokine induzierbare COX-2 Arachidonsäure zu PGH₂, das sofort durch mPGES-1 oder mPGES-2 weiter zu PGE₂ metabolisiert wird. Schwarze Pfeile: Umwandlung; schwarze gestrichelte Pfeile: Translokation; weiße Pfeile: Transkription/Translokation; rote Schrift: pharmakologische Möglichkeiten der Inhibierung der PGE₂-Synthese. C: Nach Freisetzung aus der produzierenden Zelle via passiver Diffusion oder aktivem Transport über das multidrug resistance protein (MRP) 4 bindet PGE₂ an einen der vier EP-Rezeptoren. EP1 koppelt an Gα_q und führt in mehreren Schritten zu einer intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung. EP3 koppelt an Gα_i und inhibiert die AC, was zu einer Reduktion von intrazellulärem cAMP führt. EP2 und EP4 aktivieren über Gα_s die AC und erhöhen damit die cAMP-Produktion.

Synthetisiertes PGE₂ wird entweder aktiv durch das ATP-abhängige multidrug resistance protein (MRP) 4 durch die Zellmembran aus der Zelle heraustransportiert oder diffundiert aufgrund seiner Lipophilie passiv durch die Zellmembran. PGE₂ bindet dann an einen oder mehrere der insgesamt vier membranständigen PGE₂-Rezeptoren (EP1, EP2, EP3 und EP4) (Sugimoto Y et al. 2007). Die EP-Rezeptoren haben sieben transmembranale Domänen und lösen einen G-Proteingekoppelten Signaltransduktionsweg aus (Abb. 3C). EP1 bindet an Gα_q und aktiviert den Phospholipase (PL) C-/Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3-) Signalweg. Über die Bildung der second messenger Diacylglycerol (DAG) und IP3 wird intrazelluläres Ca²⁺ freigesetzt. EP2 und EP4 führen über Gα_s zur Stimulierung der Adenylatzyklase (AC) mit der Konsequenz einer Erhöhung von intrazellulärem cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). EP3 wird hingegen als inhibitorischer Rezeptor angesehen, der über Gα_i eine Reduktion von intrazellulärem cAMP bewirkt. Allerdings existieren verschiedene Isoformen von EP3, die unterschiedliche Signaltransduktionswege (Bindung an Gα_s, Gα_i, und/oder Gα_q) benutzen und damit unterschiedliche bzw. gegensätzliche Wirkungen auf die cAMP-Konzentration haben können (Namba T et al. 1993).

PGE₂ kann in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers produziert werden. Seine biologische Wirksamkeit ist in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der gebildeten PGE₂-Menge und der Expression der vier verschiedenen Rezeptoren auf den Zielzellen sehr vielfältig und komplex.

Im zentralen Nervensystem ist PGE₂ an der Regulation der Körpertemperatur und des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt. Außerdem wurde es als Regulator des Knochenwachstums und Knochenheilung beschrieben. Die vasodilatatorischen Effekte von PGE₂ kommen bei der Embryoimplantation und bei der Regulation der Nierendurchblutung zum Tragen (Fortier MA et al. 2008). PGE₂ reguliert darüber hinaus den Tonus der glatten Muskulatur und damit den Blutdruck, den Geburtsvorgang sowie die Peristaltik und Sekretion im Gastrointestinaltrakt (Dey I et al. 2006). Bei Entzündungen ist PGE₂ an den Prozessen beteiligt, die zu den klassischen Zeichen der Entzündung führen: Rötung, Schwellung, Überwärmung und Schmerz.

2.5.1 PGE₂ in der RA

Aufgrund der Beteiligung an Entzündungsprozessen wurde PGE₂ lange Zeit als klassischer pro-inflammatorischer Mediator gesehen. Diese Rolle wird durch die anti-entzündliche Wirkung der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR, COX-Hemmer) unterstrichen, die die Aktivität von COX-1/2 und damit die Produktion von PGE₂ hemmen (Simmons DL et al. 2004). PGE₂ wurde in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA nachgewiesen; nach Behandlung mit dem NSAR Indomethacin war PGE₂ dagegen nur noch reduziert nachweisbar (Bombardieri S et al. 1981). In klinischen, doppel-blinden und placebo-kontrollierten Studien bewirken sowohl selektive COX-2-Hemmer als auch unselektive COX-Hemmer eine signifikante Reduktion der Entzündungszeichen Morgensteifigkeit und Anzahl der geschwollenen Gelenke sowie eine Verbesserung der subjektiven Schmerzeinschätzung und des Allgemeinzustandes des Patienten (Simon LS et al. 1999). Dennoch konnte bisher keine Studie eine Reduktion der Entzündungsmarker CrP und BSG oder eine Reduktion der Knochendestruktion nach Behandlung mit COX-Hemmern belegen. Dies weist darauf hin, dass PGE₂ möglicherweise auch anti-inflammatorische und/oder anti-destruktive Effekte haben könnte.

Weitere Studien unterstreichen diese Annahme. So reduzierten PGE-Analoga die Arthritis in Tierversuchen (Rossetti RG et al. 1994), PGE₁ inhibiert die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der akuten Entzündungsreaktion (Pillinger MH et al. 1995) und PGE₁ und PGE₂ inhibieren die Sekretion von MMP-1 in IL-1 β -/TNF- α -stimulierten Kaninchen-SFB (Pillinger MH et al. 2004). PGE₂ übt seine anti-inflammatorischen Effekte u.a. über die Inhibierung von NF- κ B aus, einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von ca. 40 pro-inflammatorischen Proteinen reguliert (Gomez PF et al. 2005).

Weiterhin inhibiert PGE₂ in aktivierten Makrophagen die Produktion von Zytokinen, wie TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-12 (Wu CY et al. 1998). In Typ1-T-Helferzellen inhibiert PGE₂ die Zytokinproduktion; außerdem inhibiert es über einen cAMP-abhängigen Signalweg die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation (Anastassiou ED et al. 1992). Einen wesentlichen Anteil an der Entzündung in der RA hat die Produktion von IL-17 durch T-Zellen. IL-17 ist in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten vermehrt nachweisbar (Zielkowska M et al. 2000) und induziert seinerseits weitere

pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Jovanovic DV et al. 1998). Eine prospektive Studie zeigte, dass die messenger Ribonukleinsäure- (mRNA-) Expression von TNF- α und IL-17 in RA-SFB positiv mit der Progression der Gelenkdestruktion korreliert (Kirkham BW et al. 2006). PGE₂ blockiert über einen cAMP-abhängigen Mechanismus die IL-17-Expression in aktivierten T-Zellen (Shin HC et al. 1999). Ferner supprimiert PGE₂ die IL-17-induzierte TNF- α mRNA-Expression und Proteinsynthese in Makrophagen und SFB von RA-Patienten (Faour WH et al. 2005). IL-17 stimuliert eine Erhöhung der COX-2 (mRNA- und Protein-Expression) und PGE₂ Freisetzung in humanen Chondrozyten, SFB und Makrophagen (Faour WH et al. 2003). Deshalb kann angenommen werden, dass PGE₂ durch die Inhibierung der IL-17-Expression und der IL-17-Rezeptor-Signalwege eine „negative Feedback“-Wirkung auf die T-Zell-vermittelten, pro-inflammatorischen Kaskaden bzw. die Gelenkdestruktion in der RA hat (Akaogi J et al. 2006).

In SFB erhöht PGE₂ einerseits die Synthese von IL-1 β -induziertem IL-6 und VEGF (Inoue H et al. 2002) und inhibiert andererseits die Synthese von Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (M-CSF) (Inoue H et al. 2002). Weiterhin inhibiert PGE₂ die MMP-1-Produktion in IL-1 β /TNF- α -stimulierten SFB (Pillinger MH et al. 2003) und inhibiert die Produktion des monocyte chemoattractant protein (MCP-) 1, einem Protein, das mononukleäre Zellen rekrutiert bzw. aktiviert und die Zytokinausschüttung in SFB steuert (Largo R et al. 2004). Schließlich erhöht PGE₂ die Expression von mPGES in IL-1 β -stimulierten SFB (Kojima F et al. 2003) und erhöht damit in einem positiven Feedback-Kreis seine eigene Produktion. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die anti-inflammatorischen Eigenschaften von PGE₂.

Tab. 3: PGE₂ als anti-inflammatorischer Regulator in der RA

Inflammator. Zelle	PGE ₂	Rezeptoren	Literatur
Makrophage	supprimiert pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12) & IL-12R	EP4	(Wu CY et al. 1998)
	induziert IL-10	EP2/EP4	(Shinomiya S et al. 2001)
	supprimiert die Expression von Chemokinen (CCL2, IL-8, MIP-1, IP-10)	EP4	(Takayama K et al. 2002)
Dendritische Zelle	supprimiert IL-12 und IL-6, induziert IL-10	EP4	(Kalinski P et al. 2001)
	supprimiert CCL-3, CCL-4	EP4/EP2	(Jing H et al. 2003)
Fibroblast	supprimiert M-CSF, MMP-1	EP4/EP2	(Pillinger MH et al. 2003)
	supprimiert IL-15, erhöht IL-10	EP2/EP4	(Min SY et al. 2002)
	supprimiert die CCL2-Expression	EP4	(Largo R et al. 2004)
	supprimiert IL-17-induzierte Signalwege und Effekte	EP4	(Faour WH et al. 2005)
T-Zelle	supprimiert Th-1 und erhöht Th-2 Antwort supprimiert die Expression von IL-2R, IL-2 & IFN- γ	EP2	(Betz M et al. 1991)
	supprimiert die IL-17-Expression	cAMP	(Shin HC et al. 1999)
B-Zelle	induziert den Klassenwechsel zu IgG & IgE	EP2/EP4	(Fedyk ER et al. 1996)

Modifiziert nach (Akaogi J et al. 2006)

Viele Jahre wurde PGE₂ ausschließlich als pro-inflammatorischer Regulator in der RA angesehen. Obwohl bereits in einigen *in vitro* Studien die anti-inflammatorische Wirkung von PGE₂ belegt wurde, ist die klinische Bedeutung von anti-inflammatorisch wirkendem PGE₂ und den die PGE₂-Synthese inhibierenden NSAR weitestgehend unklar. Diese Arbeit soll daher einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von PGE₂ in der RA leisten.

2.6 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 ist ein Zytokin, das von zahlreichen Zellen (wie z.B. Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten) produziert wird und z.B. auf Osteoklasten und Fibroblasten, aber auch auf Leukozyten und Hepatozyten wirkt. Das IL-6-Gen

befindet sich auf dem Chromosom 7, sein Genprodukt wird posttranslational modifiziert und hat ein Molekulargewicht zwischen 21 und 26 kDa. Es gehört zur Familie der IL-6-Zytokine, zu der auch IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin-M, ciliary neurotrophic factor und cardiotrophin-1 zählen. Diese Faktoren benutzen alle das gleiche Signaltransduktionssystem. IL-6 entfaltet seine Wirkung durch Bindung an den IL-6-Rezeptor (IL-6R), der auch als α -Kette bezeichnet wird und selbst keine signaltransduzierenden intrazellulären Domänen aufweist. Durch Bindung von IL-6 entsteht ein IL-6/IL-6R-Komplex, der mit gp130 (auch als β -Kette bezeichnet) in Kontakt tritt. Dadurch entsteht ein Heterotrimer, das eine Signaltransduktion über Janus-Kinasen auslöst. IL-6 kann auch mit löslichem IL-6R interagieren und an membranständiges gp130 binden.

Die biologischen Wirkungen von IL-6 betreffen sowohl das angeborene Immunsystem (Induktion von Akute-Phase-Proteinen wie CrP) als auch das erworbene Immunsystem (z.B. Immunglobulinproduktion). Hinzu kommen neuroendokrine Wirkungen, wie die Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse oder die Suppression der Produktion von insulin-like growth-factor 1.

Im Rahmen der RA ist IL-6 für systemische Symptome verantwortlich, wie Hypergammaglobulinämie, Thrombozytose, Autoantikörperproduktion und die Produktion des Akute-Phase-Proteins CrP. Im Gegensatz zu OA-Patienten ist die IL-6-Aktivität in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten erhöht, und erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 bei RA-Patienten korrelieren positiv mit der CrP-Konzentration und der Krankheitsaktivität (Houssiau FA et al. 1988). Ferner korrelieren erhöhte IL-6- und IL-6R-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit positiv mit der radiologisch gemessenen Gelenkdestruktion von RA-Patienten (Kotake S et al. 1996; Sack U et al. 1993). IL-6 ist im Zusammenspiel mit IL-6R direkt an der Gelenkdestruktion beteiligt, indem es die Osteoklastogenese induziert (Kotake S et al. 1996).

In Tiermodellen bestätigt sich die wichtige Rolle von IL-6 in der Pathogenese der RA. So zeigen IL-6-defiziente Mäuse im Antigen-induzierten Arthritismodell ein abgeschwächtes Krankheitsbild. Während bei den Wildtyp- (WT-) Mäusen nach

Induktion der Arthritis der Gelenkknorpel fast völlig zerstört wird, bleibt er bei IL-6-defizienten Mäusen erhalten (Ohshima S et al. 1998).

In der Therapie der schweren RA hat sich der Anti-IL-6-Rezeptor-Ak Tocilizumab etabliert. In placebo-kontrollierten Studien reduziert Tocilizumab die Krankheitsaktivität und steigert die Marker des Knochenaufbaus (Osteocalcin u.a.) im Serum, während die Marker des Knochenabbaus (Pyridinolin u.a.) reduziert sind (Nishimoto N et al. 2004). Die VEGF-Konzentrationen im Serum von RA-Patienten sind normalisiert (Nakahara H et al. 2003). Die radiologisch gemessene Progression der Knochendestruktion wird durch Tocilizumab ebenfalls reduziert (Kremer JM et al. 2011). Insgesamt sind Wirksamkeit und Sicherheit der Anti-IL-6-Therapie mit denen einer Anti-TNF- α -Therapie vergleichbar (Singh JA et al. 2011).

2.7 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Als MMPs wird eine Gruppe zinkhaltiger Enzyme bezeichnet, die mindestens eine Komponente der extrazellulären Matrix spalten. Basierend auf den strukturellen Eigenschaften und dem bevorzugten Substrat können sie in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-Typ MMPs (MT-MMPs) und andere eingeteilt werden (Tab. 4). MMPs sind aus drei strukturellen Domänen aufgebaut: die Prodomäne, die katalytische Domäne und die Hemopexindomäne. Die Sekretion erfolgt als inaktives Zymogen, die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Abspaltung der Prodomäne. Einmal freigesetzt, können MMPs nur durch äquimolare Mengen von Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs) gehemmt werden. MMPs werden auf Transkriptionsebene reguliert, mit einer Induktion der mRNA-Expression durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Tumorpromotoren, u.a. unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun (Nagase H et al. 1999).

MMPs spielen eine wichtige Rolle im Bindegewebsstoffwechsel, beim Umbau des Gelenkknorpels und außerdem in der Embryonalentwicklung, der Schwangerschaft, beim Längenwachstum, in der Wundheilung und in allen Phasen von Tumorerkrankungen (invasives Wachstum, Metastasierung und Vaskularisation) (Egeblad M et al. 2002).

Tab. 4: Matrixmetalloproteinasen und ihre Substrate

MMP	Enzym	Matrixsubstrate
MMP-1	Kollagenase-1	Kollagen I, II, III, VII, VIII, X, Gelatin, Aggrecan, Versikan u.a.
MMP-2	Gelatinase A	Kollagen I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatin, Elastin, Fibronectin u.a.
MMP-3	Stromelysin-1	Kollagen III, IV, IX, X, Gelatin, Aggrecan, Versikan, Perlecan u.a.
MMP-7	Matrilysin-1	Kollagen IV, X; Gelatin, Aggrecan, Proteoglykan link protein u.a.
MMP-8	Kollagenase-2	Kollagen I, II, III, V, VII, VIII, X, Gelatin, Aggrecan u.a.
MMP-9	Gelatinase B	Kollagen IV, V, VII, X, XIV, Gelatin, Elastin, Aggrecan u.a.
MMP-10	Stromelysin-2	Kollagen III, IV, V, Gelatin, Casein, Aggrecan, Elastin u.a.
MMP-11	Stromelysin-3	α_1 -Proteinase Inhibitor
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase	Kollagen IV, Gelatin, Elastin, α_1 -Proteinase Inhibitor, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, proTNF u.a.
MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen I, II, III, IV, Gelatin, Plasminogen Aktivator Inhibitor 2 u.a.
MMP-14	MT1-MMP	Kollagen I, II, III, Gelatin, Casein, Elastin, Fibronectin u.a.
MMP-15	MT2-MMP	proMMP-2, Gelatin, Fibronectin, Tenascin, Nidogen, Laminin
MMP-16	MT3-MMP	proMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	n.b.
MMP-18	Kollagenase-4	n.b.
MMP-19	RASI-1	Kollagen IV, Gelatin, Laminin, Nidogen, Tenascin, Fibronectin u.a.
MMP-20	Enamelysin	Amelogenin
MMP-21	XMMP	n.b.
MMP-22	CMMP	Gelatin, Casein
MMP-23	CA-MMP	n.b.
MMP-24	MT5-MMP	proMMP-2, proMMP-9, Gelatin
MMP-25	MT6-MMP	Kollagen IV, Gelatin, Fibronectin, Fibrin
MMP-26	Matrilysin-2	Kollagen IV, Fibronectin, Fibrinogen, Gelatin u.a.
MMP-28	Epilysin	Casein

n.b.: nicht bekannt

Modifiziert nach (Murphy et al. 2002)

Am Kollagenabbau im Allgemeinen und speziell in der RA sind die Kollagenasen MMP-1, -8, -13 und -14 beteiligt. Gelenkknorpel besteht (neben Proteoglykanen) hauptsächlich aus Kollagen Typ II, während in Sehnen und Knochen v.a. Kollagen Typ I zu finden ist. Die im Gelenkknorpel lokalisierten Chondrozyten produzieren hauptsächlich MMP-13, das v.a. am Abbau von Kollagen Typ II beteiligt ist, während

MMP-1 von vielen Zellen (u.a. SFB) produziert wird und viele verschiedene Kollagenarten abbaut.

Die Bedeutung der MMPs für die Pathogenese der RA konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden. So produzieren synoviale Zellen von RA-Patienten Kollagenasen (Dayer JM et al. 1976). MMP-1 und MMP-3 wurden immunhistochemisch in der Zone der Knorpeldestruktion von RA-Patienten (Sirum KL et al. 1989; Woolley DE et al. 1977) bzw. vermehrt in der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten nachgewiesen (Lohmander LS et al. 1993; Walakovits LA et al. 1992). Auf mRNA-Ebene waren MMP-13 und MMP-15 die einzigen MMPs (von 16 untersuchten MMPs), die ausschließlich in der SM von RA-Patienten, nicht jedoch in der SM von Traumapatienten nachgewiesen wurden (Konttinen YT et al. 1999).

Zusätzlich zu verschiedenen MMPs (MMP-1, -2, -3, -8 und -9) wurde auch TIMP-1 in erhöhten Mengen in der SM bzw. in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen, wobei das Verhältnis der MMPs zu den TIMPs in RA-Patienten 5,2-mal höher war als in OA-Patienten (Hembry RM et al. 1995; Yoshihara Y et al. 2000). Obwohl neben der MMP-Expression also auch die TIMP-Expression in der RA-SM verstärkt ist, können die TIMPs die matrixdegradierenden Enzyme offensichtlich nur unvollständig hemmen (Alsalameh S et al. 2003).

Lange wurde davon ausgegangen, dass MMP-1 seine Rolle in der Pathogenese der RA vor allem als matrixabbauendes Enzym ausübt. Mittlerweile wurde allerdings in Brustkrebszellen gezeigt, dass MMP-1 über den Rezeptor Protease Activated Receptor- (PAR-) 1 auch direkt die Invasion und Tumorgenese fördert (Boire A et al. 2005). Für Melanomzellen wurde gezeigt, dass tumor-produziertes MMP-1 über einen autokrinen MMP-1/PAR-1 Weg Einfluss auf die Genexpression der Melanomzellen nimmt, d.h. MMP-1 induziert die Expression von einigen Genen, die mit invasiven Eigenschaften assoziiert sind (Blackburn JS et al. 2009). Es wird daher vermutet, dass in aktivierten RA-SFB ein ähnlicher Signalweg eine Rolle spielen könnte, d.h. PAR-1 wird auf RA-SFB exprimiert (Furuhashi I et al. 2008) und der MMP-1/PAR-1 Signalweg könnte die Genexpression der RA-SFB oder der benachbarten Chondrozyten verändern (Eck SM et al. 2009). Dies würde bedeuten, dass MMP-1 in Analogie zur Tumorbilogie in der Pathogenese der RA eine weitere

bedeutende Rolle zukommt. Umso wichtiger wären therapeutische Ansätze zur Reduktion der Genexpression von MMP-1.

3 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung von PGE_2 für die Pathogenese der RA genauer zu analysieren. Um den Beitrag der SFB zu den pathophysiologischen Vorgängen der Entzündung besser zu charakterisieren, wurde ein spezielles Reinigungsverfahren zur Isolierung primärer RA-SFB benutzt, das eine hochreine SFB-Population ergibt. Außerdem wurden für die Versuche RA-SFB in niedrigen Passagen verwendet, die auch nach der Isolation noch eine hohe Ähnlichkeit zum *in vivo* RA-Phänotyp aufweisen. Aufgrund der Bedeutung von $\text{TNF-}\alpha$ in der Pathogenese der RA und des Erfolges der $\text{TNF-}\alpha$ -Hemmer in der klinischen Praxis sollte die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ auf die SFB besser untersucht werden, weshalb die Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ als methodischer Ansatz gewählt wurde.

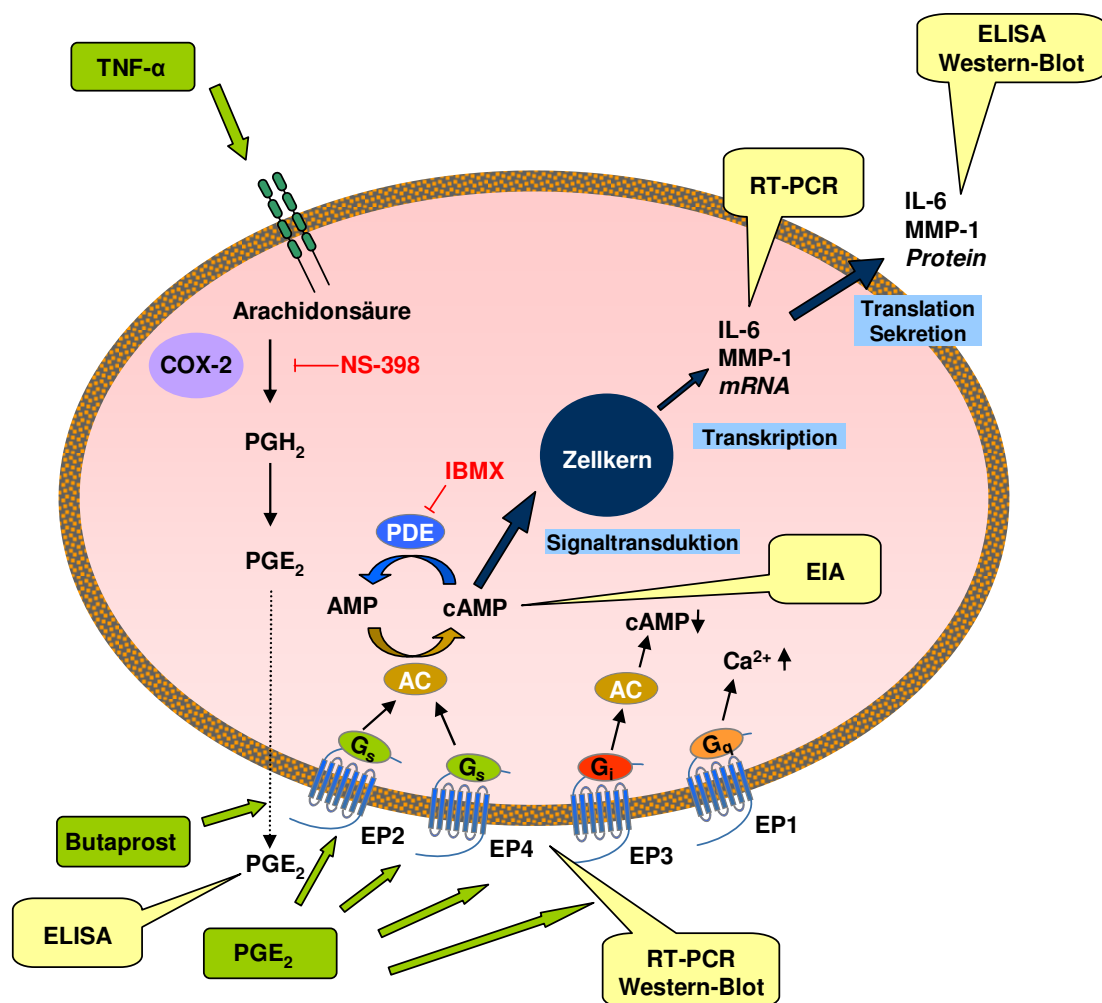


Abbildung 4: Arbeitskonzept

Schematisch dargestellt ist ein RA-SFB mit den Signalwegen nach Stimulierung mit $\text{TNF-}\alpha$, PGE_2 und/oder Butaprost. Gelb unterlegt sind die laborchemischen Methoden mit Verweis auf die erfassten Parameter. ELISA: Enzyme-linked immuno sorbent assay; EIA: Enzyme

Immunoassay; PCR: Polymerase-Kettenreaktion; COX: Cyclooxygenase; AC: Adenylatzyklase; PDE: Phosphodiesterase; IBMX: Isobutyl-Methylxanthin; NS-398: COX-2-Hemmer

Um die Wirkung von PGE₂ weiter zu charakterisieren, wurde ein COX-2-Hemmer verwendet. Damit sollten insbesondere die pro-inflammatorischen bzw. pro-destruktiven Effekte von PGE₂ untersucht werden. Stellvertretend für die pro-inflammatorischen Effekte wurde IL-6, stellvertretend für die pro-destruktiven Effekte MMP-1 untersucht. Die Untersuchungen umfassten dabei Analysen der mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1 in RA-SFB; weiterhin wurde die Proteinmenge von IL-6 und MMP-1 in den Überständen der Zellen analysiert (Abb. 4).

Ferner sollten die intrazellulären Signalwege untersucht werden, die an der Vermittlung der pro-inflammatorischen und pro-destruktiven Effekte von PGE₂ beteiligt sind. Dafür wurde zunächst die Regulation der EP-Rezeptor-Expression nach Stimulierung untersucht, dann wurden spezifische EP-Rezeptor-Agonisten zur Differenzierung der einzelnen Effekte eingesetzt. Abschließend wurde der cAMP-Signalweg mithilfe eines Inhibitors der Adenylatzyklase (AC) und eines Inhibitors der Phosphodiesterase (PDE) weiter untersucht.

Insgesamt sollten Aussagen getroffen werden über:

- Den zeitlichen Verlauf des PGE₂-Anstiegs nach TNF- α -Stimulierung
- Die EP-Rezeptor-Expression auf RA-SFB und ihre Regulation nach TNF- α -Stimulierung
- Die Regulation von IL-6 und MMP-1 nach Stimulierung mit TNF- α und Hemmung der COX-2 mit einem spezifischen Inhibitor
- Den post-Rezeptor Signalweg, der von PGE₂ zur Modulation der pro-inflammatorischen und pro-destruktiven Eigenschaften von RA-SFB genutzt wird

Die gewonnenen Erkenntnisse sollten das Verständnis pro-inflammatorischer und pro-destruktiver Prozesse in der Pathogenese der RA erweitern und so einen Beitrag zur Therapieoptimierung leisten, v.a. in Hinblick auf die Prävention von Knorpel-/Knochendestruktion und der damit verbundenen Immobilität und Invalidität von Patienten.

4 Material und Methoden

4.1 Patienten

Proben von Synovialmembranen (SM) von Patienten mit RA wurden im Rahmen von Gelenkersatzoperationen bzw. arthroskopischen oder offenen Synovektomien in der Orthopädischen Klinik „Rudolf Elle“ (Eisenberg, Deutschland) gewonnen. Eine Übersicht über die klinischen Charakteristika der Patienten zeigt Tab. 5. Die Patienten erfüllten die im Jahre 1987 überarbeiteten Kriterien des ACR für die RA (Arnett FC et al. 1988). Die Patienten wurden über die Nutzung der Proben für Forschungszwecke aufgeklärt und stimmten der Teilnahme an der Studie zu. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt (Aktenzeichen 1830-07/06).

Tab. 5: Klinische Charakteristika der RA-Patienten

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dauer der Erkrankung (Jahre)	RF	BSG (mm/h)	CrP (mg/l)	Anzahl der ACR-Kriterien
EB 87	w	65	12	+	50	106,7	5
EB 124	m	59	10	+	46	53,6	7
EB 169	w	45	13	+	8	8,3	4
EB 189	w	65	10	+	10	1,6	7
EB 233	w	66	4	+	7	0,9	4

RF: Rheumafaktor; BSG: Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; CrP: C-reaktives Protein; ACR: American College of Rheumatology; w: weiblich; m: männlich; + positiv

4.2 Gewinnung und Kultur von SFB aus der SM von RA-Patienten

4.2.1 Isolierung von Zellen aus der SM

Die SM wurde nach Entnahme in Kulturmedium [Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)/12,5 mM HEPES (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Penicillin (10.000 Einheiten/ml), Streptomycin (10 µg/ml) (beide Antibiotika PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich); wird im Folgenden als Kulturmedium bezeichnet] mit 10% fötalem Kälberserum (FKS; Biowhittaker, Walkersville, MN, USA) überführt. Die

Zellisolierung erfolgte innerhalb von 2 Stunden. Dafür wurde das Gewebe für 30 min bei 37°C mit 0,1% Trypsin (Invitrogen)/Phosphate-buffered saline [PBS, 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄ (alles Roth, Karlsruhe, Deutschland)] inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücke in 0,1% Kollagenase P (Roche, Mannheim, Deutschland)/DMEM/10% FKS überführt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch ein steriles Sieb (50 µm Poren; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) filtriert, abzentrifugiert (10 min, 280 g) und zweimal mit Kulturmedium/10% FKS gewaschen. Die Zellen wurden in Kulturmedium/10% FKS aufgenommen und in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/Flasche in Kulturflaschen (Kulturfläche: 150 cm²; Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät.

4.2.2 Reinigung der SFB mittels Anti-CD14 mAk gekoppelter Magnetobeads

Nach 7 Tagen Kultivierung wurden die Zellen einem Reinigungsschritt mittels Anti-CD14 mAk-gekoppelter Magnetobeads unterzogen (Zimmermann T et al. 2001). Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 0,25% Trypsin in Versene verdünnt (beides Invitrogen), auf den Zellen verteilt und die Kultur für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen von der Kulturflasche wurden diese zum Inaktivieren des Trypsins in Kulturmedium mit 10% FKS suspendiert und für 3 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen. Für die CD14-Trennung wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen in 1 ml PBS/2% FKS suspendiert und für 1 h bei 4°C unter Rotation mit der vierfachen Menge Anti-CD14 mAk-gekoppelter Dynabeads[®] M-450 CD14 (Klon RNO 52; Dynal, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

Die CD14-positiven Zellen (Makrophagen) wurden mithilfe des Magneten Dynal-MPC[®] (Dynal) abgetrennt, der Überstand mit den Fibroblasten wurde abgenommen und gesammelt. Die Zellen aus dem Überstand wurden zentrifugiert, zweimal mit PBS/2% FKS gewaschen und die Zellzahl mittels Zählung in der Neubauer-Kammer bestimmt.

4.2.3 Charakterisierung und Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie

Um die Reinheit der mittels Anti-CD14 mAk-gekoppelter Magnetobeads negativ isolierten SFB zu bestimmen, wurde ein Teil der Zellen unmittelbar nach der

Reinigung mittels Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell-sorting, FACS) analysiert (Kunisch E et al. 2004).

Für die Detektion von Oberflächenproteinen wurden die Zellen zunächst für 30 min bei 4°C mit dem jeweiligen Antikörper (in PBS/1% FKS verdünnt) inkubiert (Tab. 6). Danach wurden sie für 30 min bei 4°C mit einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Ziege-Anti-Maus-Ak (Dako, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen mittels Zentrifugation (3 min, 290 g) dreimal mit FACS-PBS (PBS/1% FKS) gewaschen. Für die Detektion von intrazellulären Proteinen (Prolyl-4-Hydroxylase) wurden die Zellen für 10 min bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd (PFA; Fluka, Steinheim, Deutschland)/PBS fixiert. Um die intrazellulär lokalisierten Proteine zugänglich zu machen, folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit Permeabilisierungspuffer [PE-Puffer; PBS/1% FKS/0,5% Saponin (Serva, Heidelberg, Deutschland)]. Die Verdünnung der Ak und die anschließenden Waschschrte erfolgten in PE-Puffer. Die Zellen wurden dann für 45 min bei 4°C mit dem jeweiligen Antigen-spezifischen primären Ak inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Detektion des primären Ak mittels eines sekundären, FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus Ak (45 min, 4°C, Dako). Nach Inkubation mit dem sekundären Ak wurden die Zellen durch dreimaliges Zentrifugieren in FACS-PBS überführt.

Tab. 6: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper

Antikörper	Erkanntes Antigen	Zelluläre Lokalisation	Zelluläre Expression	Konzentration (µg/ml)	Hersteller
IgG1		Isotyp-Kontrolle		10	Dako
TÜK4	CD14	Membran	Monozyten/ Makrophagen	10	Dako
TM316	CD11b	Membran	Monozyten/ Makrophagen, PMN, NK-Zellen	10	Dianova
3-2B12	Prolyl-4-Hydroxylase	Zytoplasma	Fibroblasten, Endothelzellen	10	Dianova

PMN: Polymorphkernige neutrophile Leukozyten; NK-Zellen: natürliche Killerzellen

Nach der Färbung wurden die Zellen mit einem FACSScanTM Gerät analysiert (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Während der Messung wurden jeweils

10.000 Zellen erfasst. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Cell Quest[®] (Becton Dickinson). „Forward“ und „side scatter gates“ wurden so gesetzt, dass nur die lebenden Zellen erfasst wurden. Durch die Autofluoreszenz der Zellen und die unspezifische Immunglobulin-Bindung wird in der Durchflusszytometrie eine Hintergrundfärbung hervorgerufen. Um diese zu berücksichtigen, wurde in der Färbung mit der jeweiligen Isotyp-Kontrolle ein „Gate“ gesetzt. Dabei wurden ca. 99% der falsch positiven Zellen ausgeschlossen. Da 95% der SFB positiv für den Fibroblastenmarker Prolyl-4-Hydroxylase sind und weniger als 2% der Zellen positiv für die Makrophagenmarker CD14 und CD11b, kann von einer nahezu reinen Fibroblastenpopulation ausgegangen werden (>98%) (Zimmermann T et al. 2001).

Eine Verunreinigung durch Mykoplasmen wurde mithilfe von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen [4'-6 Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) oder Bisbenzimid, Hoechst 33258] ausgeschlossen.

Die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der SFB wurden dankenswerterweise von Frau Dr. E. Kunisch und Frau B. Lanick (AG Experimentelle Rheumatologie) durchgeführt.

4.2.4 Kultur von SFB

Die gereinigten Zellen wurden entweder direkt weiter kultiviert oder bis zur Kultivierung in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Das Kulturmedium/10% FKS wurde dreimal pro Woche gewechselt und die Zellen wurden bei Konfluenz weiter passagiert, d.h. trypsinisiert (s. 4.2.2) und im Verhältnis 1:2 auf Kulturflaschen verteilt. Für die Versuche wurden Zellen in der 4. bis 6. Passage verwendet.

4.3 Stimulierungen von SFB

4.3.1 Stimulierung von SFB für die mRNA Analyse

Die SFB wurden in 6-Loch-Platten (BD Biosciences Labware, Heidelberg, Deutschland) in einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro Loch ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturmedium/10% FKS kultiviert. In Abhängigkeit vom Versuchsaufbau wurden die Zellen vor den Stimulierungen einmal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium für 30 min mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 (1 µM, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) präinkubiert.

Die anschließenden Stimulierungen erfolgten mit TNF- α (10 ng/ml, recombinant human TNF- α , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), PGE₂ (1 μ M), dem selektiven EP2-Agonisten Butaprost (1 bzw. 10 μ M, beides Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), selektiven EP-Rezeptor-Agonisten (alle 10 μ M; EP1 ONO-DI-004; EP2 ONO-AE1-259; EP3 ONO-AE-248; EP4 ONO-AE1-329 von Ono Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan) und/oder IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthine, 100 μ M; Calbiochem, San Diego, CA, USA). Nach 24 h wurden die Überstände für weitere Analysen wie Zytokinbestimmungen gesammelt und bei -80°C gelagert. Dann wurden die SFB zweimal mit PBS gewaschen und zur RNA-Isolierung geerntet.

Die Stimulierungen mit den selektiven EP-Agonisten wurden von Dr. F. Kojima durchgeführt; die EP-Agonisten wurden freundlicherweise von Prof. S. Kawai, Toho Universität, Omori-Nishi, Ota-ku, Tokio 143-8541, Japan zur Verfügung gestellt.

4.3.2 Stimulierung von SFB für die cAMP-Messung

Für die Messung der cAMP-Produktion wurden die SFB in 12-Loch-Platten in einer Dichte von 2×10^5 pro Loch ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturmedium mit 10% FKS kultiviert. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen in serumfreiem Medium stimuliert. Für die zeitabhängige Aktivierung von cAMP nach Stimulierung mit TNF- α (10 ng/ml) und Präinkubation mit NS-398 (1 μ M) wurden die Zellen nach 0, 3, 6, 12 bzw. 24 h geerntet; für die zeitabhängige Aktivierung nach Stimulierung mit PGE₂ (1 μ M) wurden die Zellen nach 0, 15, 30, 60, 120 bzw. 240 min geerntet. In beiden Fällen wurde der cAMP-Gehalt mittels EIA cAMP Kits bestimmt (s. 4.6.2).

4.4 Bestimmung der mRNA-Expression in SFB

4.4.1 Isolierung der RNA aus SFB

Die RNA von 2×10^5 Zellen wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (NucleoSpin[®] RNA der Firma Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach der Vorschrift des Herstellers isoliert. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend direkt in der Platte mit 400 μ l Lysispuffer lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 4 μ l Mercaptoethanol (Roth) versetzt und gut gemischt. Danach wurden 300 μ l von 96%-igem Ethanol (Roth)

hinzugefügt, die Lösung ein weiteres Mal gemischt und dann auf eine NucleoSpin®-Säule überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (30 sec, 800 g). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert (1 min, 1000 g). Danach folgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt der Säule mit DNase I, um eventuell in den Proben vorhandene DNA abzubauen. Daraufhin wurden 500 µl DNase-Inaktivierungspuffer zugegeben und die Säule zentrifugiert (30 sec, 800 g). Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde nun zweimal mit Puffer RA3 gewaschen (600 µl Puffer, 30 sec, 800 g; 250 µl Puffer, 2 min, 1000 g). Anschließend wurde die RNA mit 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C für maximal 4 Wochen gelagert.

4.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Menge der hergestellten RNA wurde mithilfe eines Spektrophotometers (Nanodrop®, Peqlab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Die Konzentration der RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times V \times 40$$

Dabei beschreibt V das Verhältnis von eingesetztem H₂O zu eingesetzter RNA. Zur cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt.

4.4.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels Superscript II reverser Transkriptase (Invitrogen). Von jeder Probe wurden unter Einsatz von 1 µg RNA jeweils 20 µl cDNA synthetisiert. Hierfür wurde ein Mastermix aus 10 mM 1,5 µl dNTP (2'-desoxynukleosid 5'-triphosphat, Roche) und 1,5 µl Oligo(dT)-Primer (500 µg/ml; Dr. E Birch-Hirschfeld, Institut für Virologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland) angefertigt und auf Röhrchen verteilt. Dann wurde die entsprechende Menge RNase-freies Wasser/RNA zugegeben, und die Röhrchen wurden für 10 min bei 70°C inkubiert, kurz auf Eis gestellt und zentrifugiert. Anschließend wurden 6 µl 5 x "First Strand Puffer", 3 µl 0,1 M DTT (Dithiothreitol, beides Invitrogen) und 1 µl Superscript II (200 U/µl) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 50 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde das Enzym für 10 min bei 70°C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.4.4 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) beruht auf der exponentiellen *in vitro*-Replikation eines zu amplifizierenden cDNA-Fragmentes mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase [z.B. Taq-Polymerase; (Saiki RK et al. 1988)] und synthetisch hergestellter Oligonukleotide [„Primer“; (Mullis KB 1990)].

4.4.4.1 PCR-Bedingungen

Die konventionelle PCR wurde in Ansätzen mit einem Volumen von jeweils 25 µl durchgeführt. In dem Mastermix waren pro Ansatz enthalten: 0,5 µl cDNA, 2,5 µl 10 x Puffer, 0,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTP Mix (alles Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), je 0,5 µl 10 mM beider Primer, 0,125 µl Hot Star Taq Polymerase (Qiagen, Valencia, CA, USA) sowie 19,875 µl H₂O. In jedem Experiment wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die an Stelle des DNA-Templates H₂O enthielt (Negativkontrolle).

Tab. 7: Eingesetzte Primersequenzen

Gen		Primer (5'-3')	Zyklenzahl
MMP-1	sense	5'-AAC TCT GGA GTA ATG TCA CAC-3'	23
	antisense	5'-ATT CGT AAG CAG CTT CAA GCC-3'	
MMP-13	sense	5'-CCG AGA AAT GCA GTC TTT CTT-3'	27
	antisense	5'-AAT GGG TAG AAG TCG CCA TGC-3'	
CCL2	sense	5'-GCC TCC AGC ATG AAA GTC TC-3'	24
	antisense	5'-TAA AAC AGG GTG TCT GGG GA-3'	
IL-6	sense	5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3'	25
	antisense	5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3'	
IL-8	sense	5'-CTG CGC CAA CAC AGA AAT TA-3'	23
	antisense	5'-ATT GCA TCT GGC AAC CCT AC-3'	
GAPDH	sense	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'	26
	antisense	5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'	

Die eingesetzten Primer (Tab. 7) wurden von Frau Prof. Dr. L.J. Crofford, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA zur Verfügung gestellt. Die PCRs wurden in

einem Mastercycler Personal durchgeführt (Eppendorf, Hamburg). Nach dem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 min folgte die Denaturierung für 30 s bei 95°C, die Primeranlagerung für 30 s bei 56°C und die Elongation für 45 s bei 72°C, mit einem abschließenden Elongationsschritt für 5 min bei 72°C. Die Anzahl der Zyklen wurde für jedes Gen einzeln etabliert. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Housekeeping-Gen benutzt, da sie nach Stimulierung keine Veränderung in der Expression zeigt. Die PCR-Produkte wurden mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt.

4.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Quantität der Produkte der konventionellen PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es wurden 2%-ige Gele eingesetzt.

In Anschluss an die PCRs wurden je 10 µl des PCR-Produktes auf Agarosegelen (Invitrogen) mit 0,2% Ethidiumbromid (Roth) für 30 min bei 80 V aufgetrennt. Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und die Fotos für die Auswertung gespeichert (E.A.S.Y RH-3 Herolab, Wiesloch, Deutschland).

4.4.6 Densitometrische Auswertung der PCR-Gele

Die Bandenintensität wurde mithilfe des Programms Scion Image ermittelt (Scion Corporation, Frederick, USA). Hierfür wurde eine Region von gleicher Größe über die jeweilige Bande gelegt und die integrierte Dichte bestimmt. Die integrierte Dichte gibt die Summe aller Grauwerte in der ausgewählten Region nach Abzug des Hintergrundes an. Die integrierte Dichte eines bestimmten PCR-Produkts wurde dann mit der integrierten Dichte des entsprechenden GAPDH PCR-Produkts verglichen und das Ergebnis als x-fache Expression in der cDNA der SFB im Vergleich zu GAPDH ausgedrückt.

4.4.7 Bestimmung der Gen-Expression mittels real-time PCR

Die Methode der real-time PCR erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge des PCR-Produktes und kann in Echtzeit (real-time) dargestellt werden. Hierbei können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe

und Sonden zum Einsatz kommen: SYBR Green I ist ein ungekoppelter Fluoreszenzfarbstoff und bindet generell an jede doppelsträngige DNA (Higuchi R et al. 1992). Die Bestimmung der Gen-Expression mittels real-time PCR wurde in einem RealPlex® Thermocycler durchgeführt (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Die real-time PCR wurde in Ansätzen von jeweils 20 µl Volumen in einer 96-Loch-Platte durchgeführt. In den Ansätzen waren enthalten: 10 µl der 1:10 verdünnten cDNA bzw. Standards und 10 µl eines real-time PCR Mixes. Dieser real-time PCR Mix enthielt je 300 ng beider Primer, 400 µM dNTPs, 3,5 mM MgCl₂, 40 ng/ml Bovines Serum Albumin (BSA), 0,05 U HotMaster DNA Polymerase und SYBR Green I (Verdünnung 1:1250). Die Primersequenzen und die genspezifischen Annealing- und Melting-Temperaturen können der Tab. 8 entnommen werden. Nach dem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 min folgten die Zyklen mit: Denaturierung bei 95°C, Primeranlagerung („Annealing“, Tab. 8), Verlängerung („Elongation“) bei 68°C und Abschmelzen („Melting“, Tab. 8) für 8 s. Es wurden insgesamt 40 Zyklen durchlaufen, danach folgte die Endverlängerung und anschließende Kühlung bei 4°C bis zur Weiterverwendung.

Tab. 8: Eingesetzte Primersequenzen, Annealing- und Melting-Temperatur

Gen		Primer (5'-3')	Annealing-/ Melting-Temp.
EP1	sense	5-CTT GTC GGT ATC ATG GTG GTG TC-3	60/82
	antisense	5-GGT TGT GCT TAG AAG TGG CTG AGG-3	
EP2	sense	5-CCA CCT CAT TCT CCT GGC TA-3	60/82
	antisense	5-CGA CAA CAG AGG ACT GAA CG-3	
EP3	sense	5-CTT CGC ATA ACT GGG GCA AC-3	60/82
	antisense	5-TCT CCG TGT GTG TCT TGC AG-3	
EP4	sense	5-TGG TAT GTG GGC TGG CTG-3	60/82
	antisense	5-GAG GAC GGT GGC GAG AAT-3	
Aldolase	sense	5-TCA TCC TCT TCC ATG AGA CAC TCT-3	58/82
	antisense	5-ATT CTG CTG GCA GAT ACT GGC ATA A-3	
	antisense	5-GTT AGC TTA CTG TCA CAC GC-3	

Die emittierte Fluoreszenz wurde am Ende jedes Zyklus und während der Schmelzkurve kontinuierlich gemessen. Die Konzentration der analysierten PCR-Produkte für jedes Gen wurde mit dem RealPlex[®] Programm (Eppendorf) über Standardreihen berechnet. Die Standardreihen wurden über eine Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA erstellt, die die codierende Sequenz des zu analysierenden Gens enthielt.

Zur Normalisierung der cDNA in jeder Probe wurde das Housekeeping-Gen Aldolase verwendet. Die Spezifität der Produkte der real-time PCR wurde mittels (i) einer Analyse der Schmelzkurve sowie (ii) Agarose-Gel Elektrophorese und (iii) initialer Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt.

4.5 Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Überständen

Die Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Überständen wurde nach Stimulierung der SFB (wie unter 4.3.1 beschrieben) mithilfe eines kommerziellen ELISA Kits (BD OptEIA[™], BD, Heidelberg) durchgeführt. Die Microtiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit dem Capture-Antikörper (1:250 in 0,1 M Bikarbonatpuffer verdünnt) beschichtet. Danach wurden die Microtiterplatten für 2 h bei RT mit 3% BSA geblockt und anschließend 4 x mit PBS/0,1% Tween gewaschen. Der Standard (600 pg/ml – 4,69 pg/ml) und die Proben wurden in DMEM verdünnt, auf die Microtiterplatten aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten 4 x mit PBS/0,1% Tween gewaschen und mit dem Detektions-Ak (Verdünnung 1:250 in 1% BSA/PBS/Tween) und Enzym-Reagenz (Verdünnung 1:250 in 1% BSA/PBS/Tween) für 90 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten 8 x mit PBS/0,1% Tween gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels der Substratlösung Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid. Die Reaktion wurde mit 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Messung bei 450 nm in einem ELISA-Reader (FluostarOptima, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) durchgeführt. Die Berechnung der IL-6-Konzentration erfolgte anhand der Eichgerade.

Die Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Überständen wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Kunisch durchgeführt.

4.6 Messung von intrazellulärem cAMP

4.6.1 Probenvorbereitung

Die SFB wurden in der oben genannten Dichte ausgesät und stimuliert (s. 4.3.2). Nach der jeweiligen Stimulierungszeit wurde das Medium entfernt und pro Loch 500 µl 0,1 M HCl zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Zelllysate abgekratzt und in ein neues Röhrchen transferiert. Die Zelllysate wurden dann für 10 min bei 1000 rcf zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

4.6.2 Bestimmung des cAMP mittels EIA cAMP Kits

Die Analyse des intrazellulären cAMP wurde mit dem kompetitiven Enzyme Immunoassay (EIA) Kit von Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) laut Herstellerangaben durchgeführt. EIA Puffer, Waschpuffer, cAMP Acetylcholinesterase Tracer, cAMP-Standard und cAMP-Antiserum wurden laut Herstellerangaben mit den mitgelieferten Substanzen hergestellt.

Die Proben wurden zunächst 1:2 verdünnt, dann wurde die 96-Loch-Platte (mit Maus-Anti-Hase-IgG beschichtet) einmal gewaschen und anschließend der cAMP-Standard (50 µl) bzw. die Proben (50 µl) und 50 µl des Tracers und 50 µl cAMP-Antiserum in die Löcher pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit Folie bedeckt und für 18 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Platte geleert, fünfmal gewaschen, das (mitgelieferte) Ellmans Reagent (200 µl pro Loch) dazugegeben, die Platte mit Folie verschlossen und nochmals für 90 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die Platte bei einer Wellenlänge von 415 nm ausgelesen. Das intrazelluläre cAMP wurde mithilfe einer Standardkurve (Konzentrationsbereich 2,34 – 300 pmol/ml) bestimmt.

4.6.3 Protein Assay

Der Proteingehalt der Proben wurde mithilfe des kommerziell erhältlichen BCA™ Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA) ermittelt. Zunächst wurde der Albumin-Standard (Konzentrationsbereich: 25 – 2000 µg/ml) laut Herstellerangaben hergestellt und jeweils 20 µl davon in die Löcher pipettiert. Dann wurden 20 µl der Proben in die Löcher verteilt. Anschließend wurden in einem 50 ml Reagenzglas 20 ml BCA™ und 400 µl Reagent B vermischt. Von diesem Gemisch wurden jeweils

200 µl in alle Löcher gegeben. Die Platte wurde in Alufolie verpackt, inkubiert (30 min, 37°C und 5% CO₂) und schließlich bei 490 nm ausgelesen. Die Proteinkonzentration wurde über einen Albuminstandard mit bekannten Konzentrationen ermittelt.

4.7 Messung von PGE₂ in den Überständen

4.7.1 Probenvorbereitung

Für die Bestimmung der PGE₂-Sekretion nach TNF-α-Stimulierung wurden SFB in 12-Loch-Platten in einer Dichte von 2×10^5 pro Loch ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturmedium/10% FKS kultiviert. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 10 ng/ml TNF-α in serumfreiem Medium stimuliert. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h wurden die Überstände gesammelt und bis zur Bestimmung von PGE₂ bei -80°C aufbewahrt.

4.7.2 Bestimmung der PGE₂-Sekretion mittels EIA Kits

Die Bestimmung der PGE₂-Sekretion von SFB nach Stimulierung mit TNF-α wurde mit einem kommerziell erhältlichen kompetitiven EIA Kit (Sensitivität: 40 pg/ml PGE₂, Biotrak™, Amersham-Pharmacia Biotech Inc., Freiburg, Deutschland) vorgenommen. Je 50 µl verdünnter Zellkulturüberstand (Verdünnung der Kontrollen 1:5; der stimulierten Proben 1:25) bzw. Standard wurden pro Loch einer 96-Loch-Platte (mit Ziege-anti-Maus IgG beschichtet) pipettiert. Dazu wurden dann jeweils 50 µl Maus-Anti-PGE₂ Ak und PGE₂-gekoppelte Peroxidase gegeben. Die Platte wurde verschlossen und unter Schütteln für 1 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden aus den Löchern abgesaugt und die Löcher viermal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden jeweils 150 µl Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine/Wasserstoffperoxid) in jedes Loch gegeben und für genau 30 min bei RT inkubiert. Die Platte wurde bei 450 nm ausgelesen. Die Konzentration von PGE₂ wurde mittels einer Standard-Kurve berechnet (Konzentrationsbereich: 50 - 6400 pg/ml).

Die Bestimmung von PGE₂ in den Überständen wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Kunisch durchgeführt.

4.8 Analyse der EP-Rezeptor-Expression und MMP-1-Konzentration mittels Western-Blot

Zur Bestimmung der EP-Rezeptor-Expression auf Proteinebene wurden 2×10^6 SFB zunächst für 24 h adhärenz kultiviert und anschließend für 30 h mit TNF- α (10 ng/ml) stimuliert. Danach wurden die SFB zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und sofort in Protein-Lysispuffer aufgenommen. Die Proben wurden dann bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Der Proteingehalt in den Proben wurde mittels BCA™ Protein Assay bestimmt (s. 4.6.3). Insgesamt 35 μ g Proteinextrakt wurden zunächst in 5 x Probenpuffer (5:1 verdünnt, inklusive Mercaptoethanol) für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf einem denaturierenden, 12%-igen Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate, SDS)-Gel bei 120 V für 90 min aufgetrennt und mit 400 mA für 50 min auf eine Blot-Membran (Hybond-C extra, Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) übertragen. Danach wurden die Membranen mit 2,5% Magermilch (Roth) in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) geblockt und über Nacht bei 4°C unter Schwenken mit den spezifischen primären Hasen-Ak gegen EP1, EP2, EP3 und EP4 [Cayman Chemicals, jeweils 1:1000 in TBS-Tween-20 (TBS-T) mit 2,5% Magermilch verdünnt] inkubiert. Die Membranen wurden 3 x für 10 min bei RT mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Esel-Anti-Hase-Ak (Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA) in TBS-T mit 2,5% Magermilch verdünnt, inkubiert. Die Proteine wurden auf den Membranen mittels Chemilumineszenz (Supersignal® West Chemiluminescent Substrate; Pierce) sichtbar gemacht. Die Zusammensetzung der Western-Blot Puffer ist in Tab. 9 aufgeführt.

Die Bestimmung der Konzentration von MMP-1 in den Überständen wurde analog mit einem spezifischen Ak gegen MMP-1 durchgeführt (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland).

Tab. 9: Zusammensetzung der Western-Blot Puffer

Protein-Lysispuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, EDTA, pH 7,4, 100 mM NP40, 1 mM Phenylmethylsulphonylfluorid, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml Pepstatin und 2 µg/ml Leupeptin
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
5 x Probenpuffer	1 ml Sammelgelpuffer, 0,8 ml Glycerol, 0,8 ml 20% SDS, 0,4 ml Mercaptoethanol, 0,2 ml Bromphenolblau (0,05%)
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris, 250 mM Glycin, SDS (50 ml einer 10% Lösung)
TBS-T	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4
10 x Blot-Puffer	10,25 M Tris/HCl, 1,92 M Glycin; bei Gebrauch 20% Methanol zugeben

Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; TBS-T: Tris-Buffered Saline Tween-20

Die Expressionsanalyse der EP-Rezeptoren mittels Western-Blot und die Bestimmung der MMP-1-Konzentration wurden dankenswerterweise von Frau Dr. Kunisch durchgeführt.

4.9 Identifikation von potenziell relevanten Transkriptionsfaktoren für die Modulation der funktionellen Effekte von TNF- α durch PGE₂

Zur bioinformatischen Analyse von potenziell involvierten Regulatoren/Transkriptionsfaktoren (TF) wurde das Programm Pscan benutzt, das eine Analyse/Vorhersage von möglichen TF-Bindungsstellen durchführt, indem es bekannte Bindestellenmotive aus den Datenbanken Transfac und Jaspar verwendet (Zambelli F et al. 2009).

Das Programm Pathway Studio[®] beinhaltet eine Datenbank, die verschiedene Arten von Interaktionen zwischen Zellkomponenten wie z.B. Proteinen speichert (Yuryev et al. 2006). Dieses Interaktionswissen wurde mithilfe eines speziellen Textalgorithmus automatisch aus wissenschaftlicher Literatur extrahiert.

Beide Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Michael Weber, Hans-Knöll-Institut, Jena, durchgeführt.

4.10 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mithilfe der Software-Programme Microsoft® Excel 2002 und Power Point 2002 als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test wurde für die statistische Analyse der Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen eingesetzt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. Die statistische Analyse wurde mithilfe des Programms SPSS 20.0 durchgeführt (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

5 Ergebnisse

5.1 Modulierender Einfluss von PGE₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6

Nach Stimulierung von RA-SFB mit TNF- α zeigte sich ein deutlicher Anstieg der IL-6 mRNA-Expression (Abb. 5B,C). Um den Einfluss von PGE₂ auf diesen Anstieg zu analysieren, wurde ein selektiver COX-2-Hemmer (NS-398) verwendet. NS-398 führte zu einer signifikanten Reduktion der Induktion der IL-6 mRNA-Expression durch TNF- α . Durch Zugabe von PGE₂ ließ sich dieser Effekt von NS-398 wieder aufheben. Die Kontrolle ohne TNF- α Stimulation und NS-398, aber mit PGE₂, unterschied sich nicht von der entsprechenden Kontrolle ohne PGE₂; die Kontrolle mit TNF- α Stimulation und PGE₂ Zugabe (aber ohne NS-398) zeigte eine signifikant höhere IL-6 mRNA-Expression als die alleinige TNF- α Stimulation. Auch dieses Ergebnis spricht für eine Verstärkung der TNF- α -induzierten IL-6 mRNA-Expression durch PGE₂. Um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen, wurde im Folgenden auf die Darstellung der beiden letztgenannten Kontrollen mit PGE₂ verzichtet (vgl. Abb. 5B mit Abb. 5C und 6A).

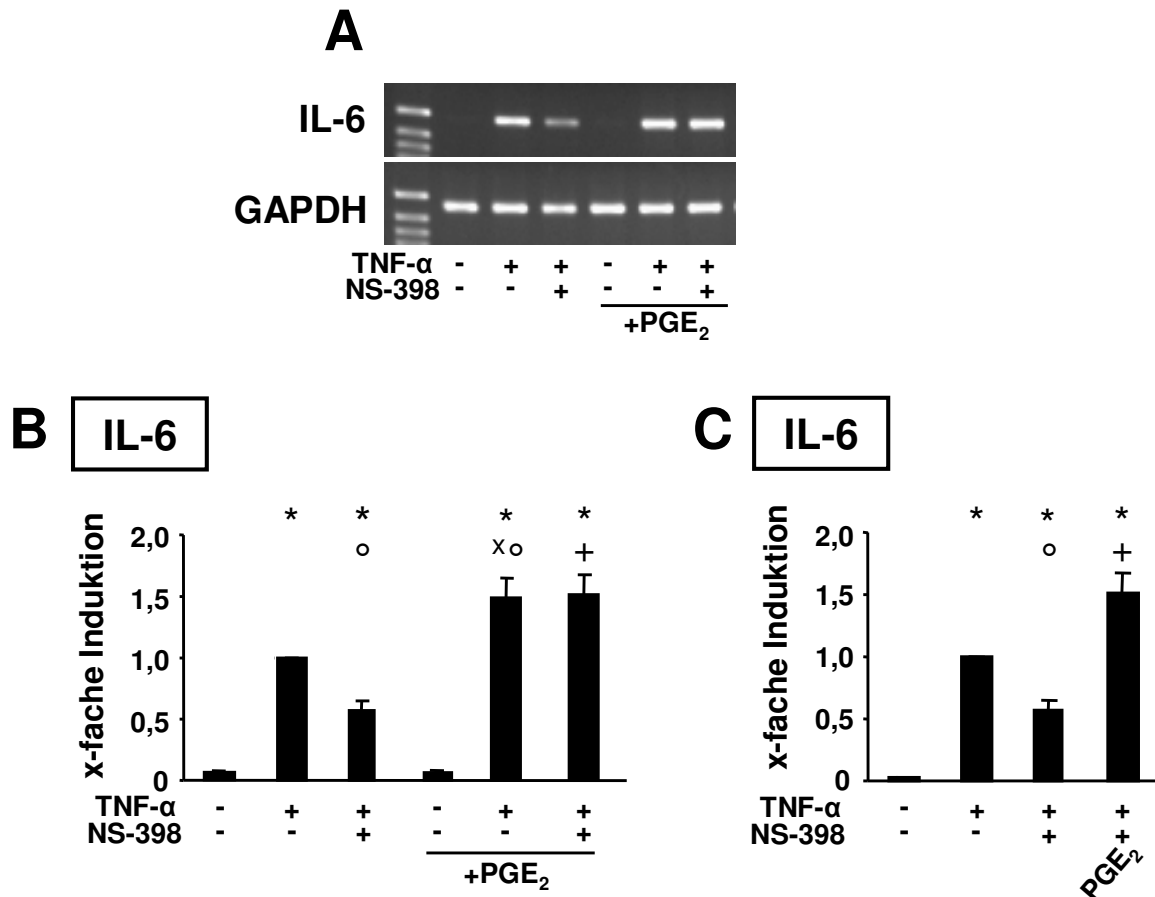


Abbildung 5: Modulierender Einfluss von PGE₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6

RA-SFB wurden für 24 h mit TNF- α (10 ng/ml) mit/ohne NS-398-Präinkubation bzw. PGE₂ stimuliert. Diese Dosierungen wurden auch in allen Folgeexperimenten eingesetzt. Die mRNA-Expression von IL-6 (n=4) wurde mit konventioneller PCR bestimmt. Gezeigt sind PCR-Gele eines repräsentativen Patienten (A). Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

° Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α

x Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu lediglich mit PGE₂ stimulierten RA-SFB

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α / NS-398

5.2 Modulierender Einfluss von PGE₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression und Proteinsekretion von IL-6 bzw. MMP-1

Wie bei IL-6 induzierte die Stimulierung mit TNF- α auch die mRNA-Expression von MMP-1 deutlich und signifikant (Abb. 6B). Dieser Effekt von TNF- α auf MMP-1 wurde durch Hemmung der COX-2 mittels NS-398 jedoch weiter verstärkt. Die externe Zugabe von PGE₂ hob den Effekt von NS-398 wieder auf. Dieser gegensätzliche

Effekt von NS-398 und PGE₂ auf IL-6 bzw. MMP-1 zeigt den modulierenden Einfluss von PGE₂ auf pro-inflammatorische (IL-6) und pro-destruktive (MMP-1) Mediatoren unter TNF- α -Stimulierung.

Analog zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene wurde eine gleichartige Modulation der Proteinsekretion von IL-6 und MMP-1 durch PGE₂ nachgewiesen (Abb. 6C, D).

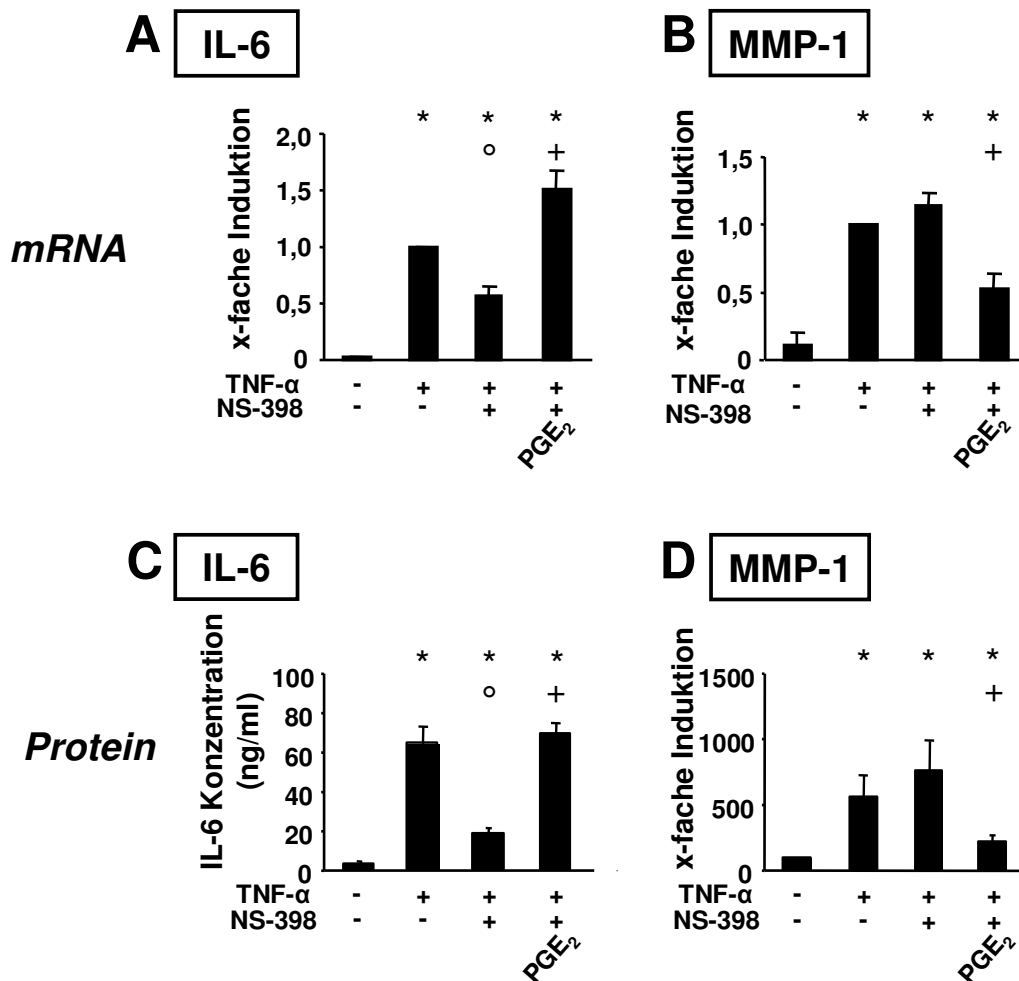


Abbildung 6: Modulierender Einfluss von PGE₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression und Proteinsekretion von IL-6 bzw. MMP-1

A+B: RA-SFB (n=4) wurden für 24 h mit TNF- α mit/ohne NS-398-Präinkubation bzw. PGE₂ stimuliert. Die mRNA-Expression von IL-6 (A) und MMP-1 (B) wurde mit konventioneller PCR bestimmt (für die Original-PCR-Gele s. Abb. 16 im Anhang).

C+D: RA-SFB (n=6) wurden analog stimuliert. Die IL-6-Sekretion (C) wurde mittels ELISA und die MMP-1-Sekretion (D) mittels Western-Blot in den Überständen der stimulierten Zellen bestimmt. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler an.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

° Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α / NS-398

5.3 Modulierender Einfluss von PGE₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-8, CCL2 und MMP-13

Wie bei IL-6 und MMP-1 induzierte die Stimulierung mit TNF- α auch die mRNA-Expression der Gene IL-8, CCL2 und MMP-13 signifikant. Dieser Effekt von TNF- α wurde im Fall von IL-8 und CCL2 durch Hemmung der COX-2 weiter verstärkt. Die externe Zugabe von PGE₂ hob den Effekt von NS-398 in unterschiedlichem Ausmaß wieder auf (Abb. 7; für die vollen Datensätze s. Abb. 17 im Anhang).

Die mRNA-Expression von MMP-13 wurde bereits durch die Zugabe von NS-398 signifikant reduziert, durch externe Zugabe von PGE₂ jedoch numerisch weiter vermindert.

Der gegensätzliche Effekt von NS-398 und PGE₂ auf die mRNA-Expression wird bei den Genen IL-6 und MMP-1 besonders deutlich (s. Abb. 6). Daher beschränkten wir uns in den weiteren Untersuchungen auf IL-6 als einen Vertreter der pro-inflammatorischen bzw. MMP-1 als einen Vertreter der pro-destruktiven Gene.

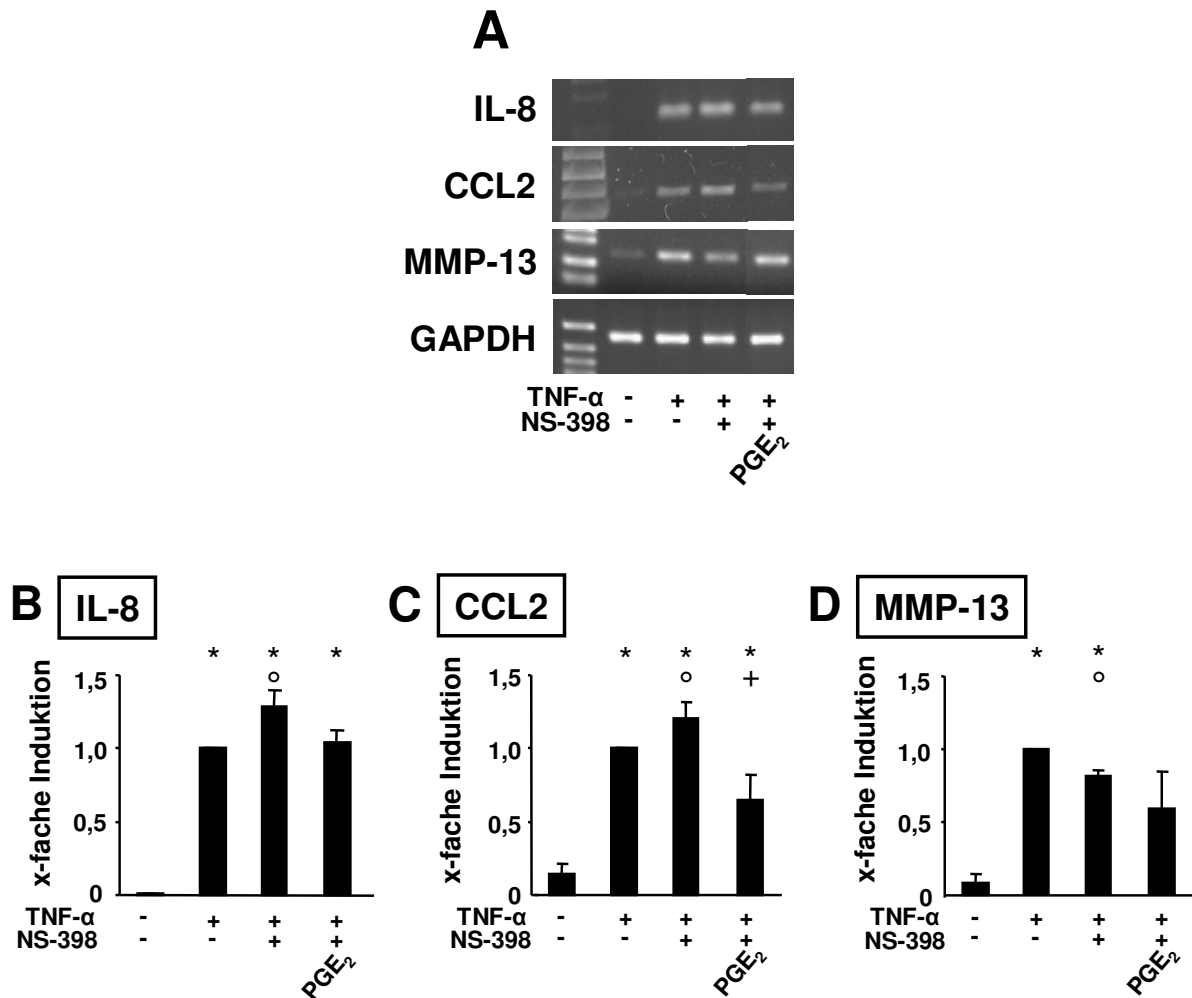


Abbildung 7: Modulierender Einfluss von PGE₂ auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-8, CCL2 und MMP-13

RA-SFB wurden für 24 h mit TNF- α mit/ohne NS-398-Präinkubation bzw. PGE₂ stimuliert. Die mRNA-Expression von IL-8 (B; n=3), CCL2 (C; n=4) und MMP-13 (D; n=3) wurde mit konventioneller PCR bestimmt. Gezeigt sind PCR-Gele eines repräsentativen Patienten (A). Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

° Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α / NS-398

5.4 Aktivierung der cAMP-abhängigen Signalkaskade durch TNF- α und PGE₂, Hemmung durch NS-398

TNF- α induzierte die Bildung von cAMP mit einem Plateau nach 6-12 h (Abb. 8A). Die Präinkubation mit NS-398 senkte die cAMP-Konzentration deutlich. Erst nach 24 h wurde der Effekt von NS-398 aufgehoben.

Bereits eine 4-stündige Stimulierung mit TNF- α führte zu einer signifikanten Erhöhung der PGE₂-Sekretion in RA-SFB (Abb. 8B). Nach 6, 8, 10 und 24 h Stimulierung kam es zu einem weiteren Anstieg der PGE₂-Sekretion. Insgesamt wurden Maximalmengen von über 2 ng/ml PGE₂ produziert.

Direkte Stimulierung der RA-SFB mit PGE₂ führte zu einem schnellen Anstieg von cAMP (Abb. 8C). Das Maximum lag bei 15 min (17-facher Anstieg der cAMP-Konzentration), danach sank die cAMP-Konzentration kontinuierlich ab und erreichte nach 4 h das Niveau der unstimulierten Kontrolle.

Eine Stimulierung von RA-SFB mit PGE₂ für 30 min steigerte die cAMP-Aktivität auf das 50-fache (Abb. 8D). Präinkubation mit dem Phosphodiesteraseinhibitor IBMX, der den Abbau von cAMP vermindert bzw. verhindert, führte zu einer weiteren Steigung der cAMP-Aktivität auf das 400-fache des Ausgangswertes.

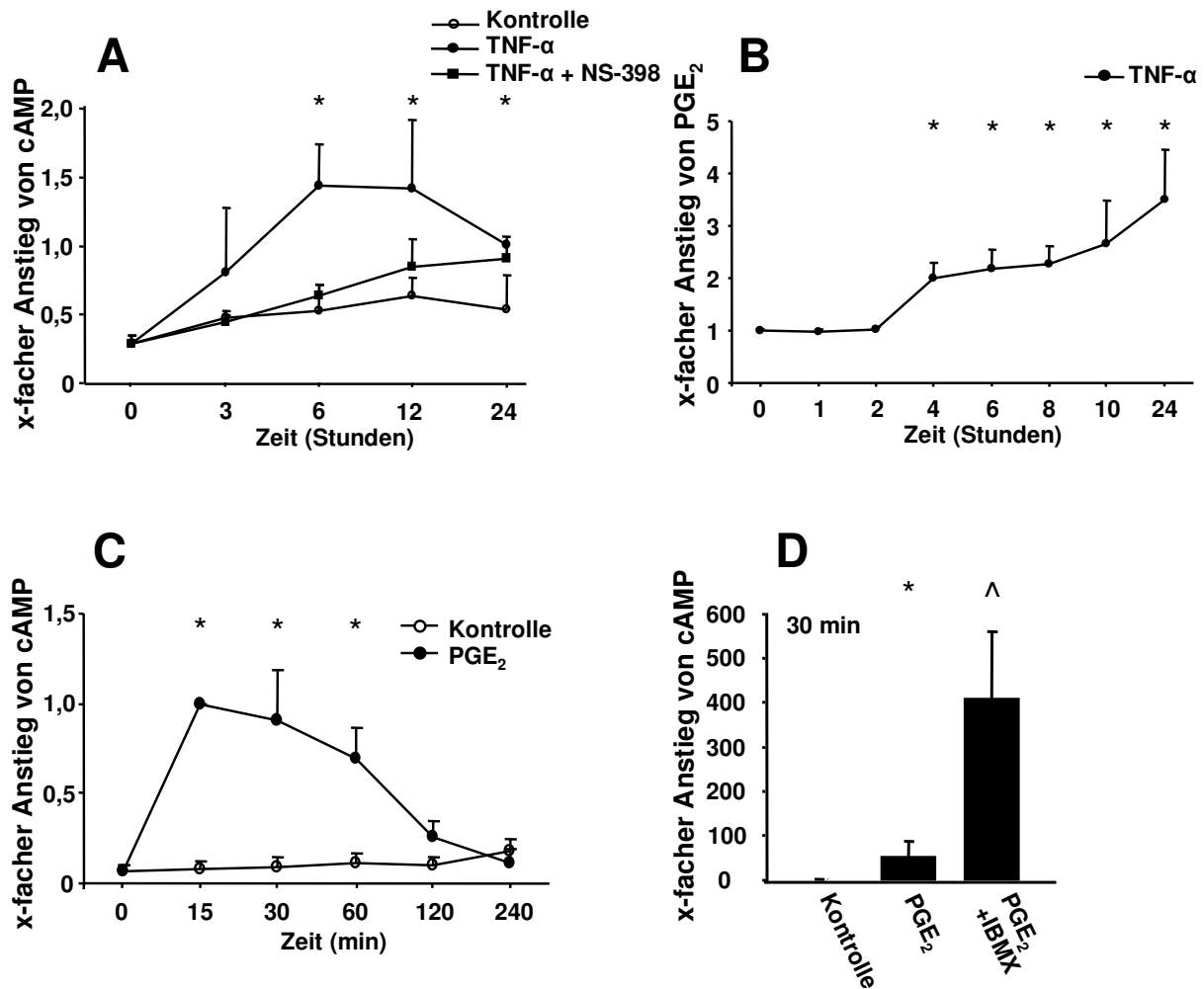


Abbildung 8: Induktion der cAMP-Bildung durch TNF-α und PGE₂, Hemmung durch NS-398

A: RA-SFB (n=3) wurden für 24 h mit TNF-α mit/ohne NS-398-Präinkubation stimuliert. Die cAMP-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven EIA Kits bestimmt.

B: RA-SFB (n=3) wurden für 24 h mit TNF-α stimuliert. Die PGE₂-Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt.

C: RA-SFB wurden für 4 h mit PGE₂ stimuliert. Die cAMP-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven EIA Kits bestimmt.

D: RA-SFB wurden für 30 min mit IBMX präinkubiert und dann für 30 min mit PGE₂ stimuliert. Die cAMP-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven EIA Kits bestimmt.

Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert mit Standardfehler.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle.

^ Signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu PGE₂.

5.5 Einfluss von TNF-α auf die EP-Rezeptor-Expression

Die mRNA-Expression von allen vier EP-Rezeptoren wurde in RA-SFB mittels PCR untersucht. TNF-α induzierte zeitabhängig die Expression von EP2 (Maximum nach

10 h), während EP4 herunterreguliert wurde (Minimum nach 10 h) (Abb. 9A). Die EP1- und EP3-Expression blieb dagegen nahezu unverändert.

Diese Daten wurden auf der Proteinebene im Western-Blot Experiment von Zell-Lysaten bestätigt. Die unstimulierten RA-SFB exprimierten alle vier EP-Rezeptoren. Nach Stimulierung mit TNF- α wurde EP2 vermehrt exprimiert, EP4 dagegen vermindert exprimiert; EP1 und EP3 blieben unverändert (Abb. 9B und C).

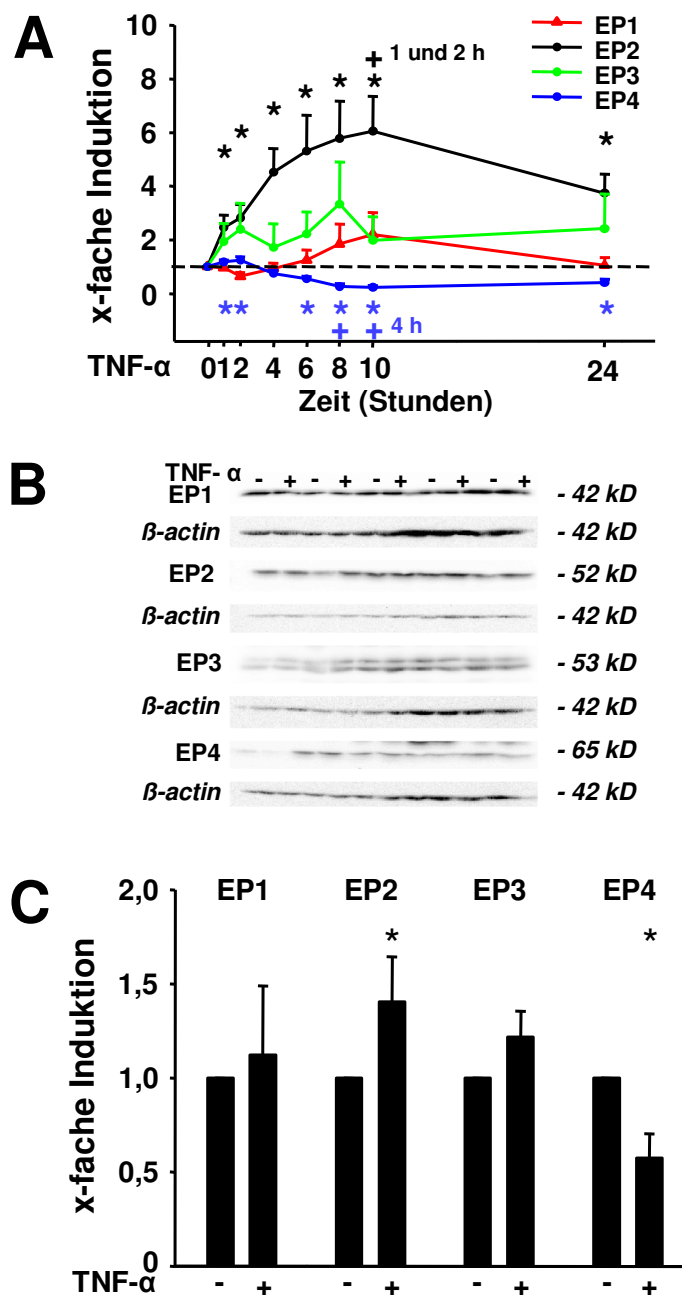


Abbildung 9: Einfluss von TNF- α auf die EP-Rezeptor-Expression in RA-SFB

RA-SFB (n=5) wurden für verschiedene Zeitpunkte (A) oder 30 h (B, C) mit TNF- α stimuliert. Die EP-Rezeptor-Expression wurde mit quantitativer RT-PCR (A) bestimmt. Der Einfluss von

TNF- α auf die EP-Rezeptor Protein-Expression in Proteinextrakten wurde im Western-Blot (B) mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen EP-Rezeptoren analysiert und quantifiziert (C). Dargestellt ist das Western-Blot Gel (B) eines repräsentativen Patienten. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert mit Standardfehler.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle.

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu den angegebenen Zeitpunkten.

5.6 Modulierender Einfluss des EP2-Agonisten Butaprost auf die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1

Im Gegensatz zur Stimulation mit PGE₂ zeigte sich nach Stimulierung von RA-SFB mit der niedrigen Konzentration des EP2-Agonisten Butaprost (1 μ M) über 4 h kein signifikanter Anstieg der cAMP-Aktivität (Abb. 10A). Erst mit einer Konzentration von 10 μ M konnte bis zum Zeitpunkt 60 min ein signifikanter cAMP-Anstieg nachgewiesen werden. Nach 2 bzw. 4 h befand sich die cAMP-Aktivität wieder auf dem Niveau der unstimulierten Kontrolle (Abb. 10A).

In den mRNA-Expressionsexperimenten wurden RA-SFB mit TNF- α , NS-398 und PGE₂ oder Butaprost (1 μ M) stimuliert. Die TNF- α -induzierte Genexpression von IL-6 (Abb. 10B) und MMP-1 (Abb. 10C) wurde von PGE₂ und Butaprost gleichsinnig und jeweils signifikant reguliert (für die vollen Datensätze s. Abb. 17 im Anhang).

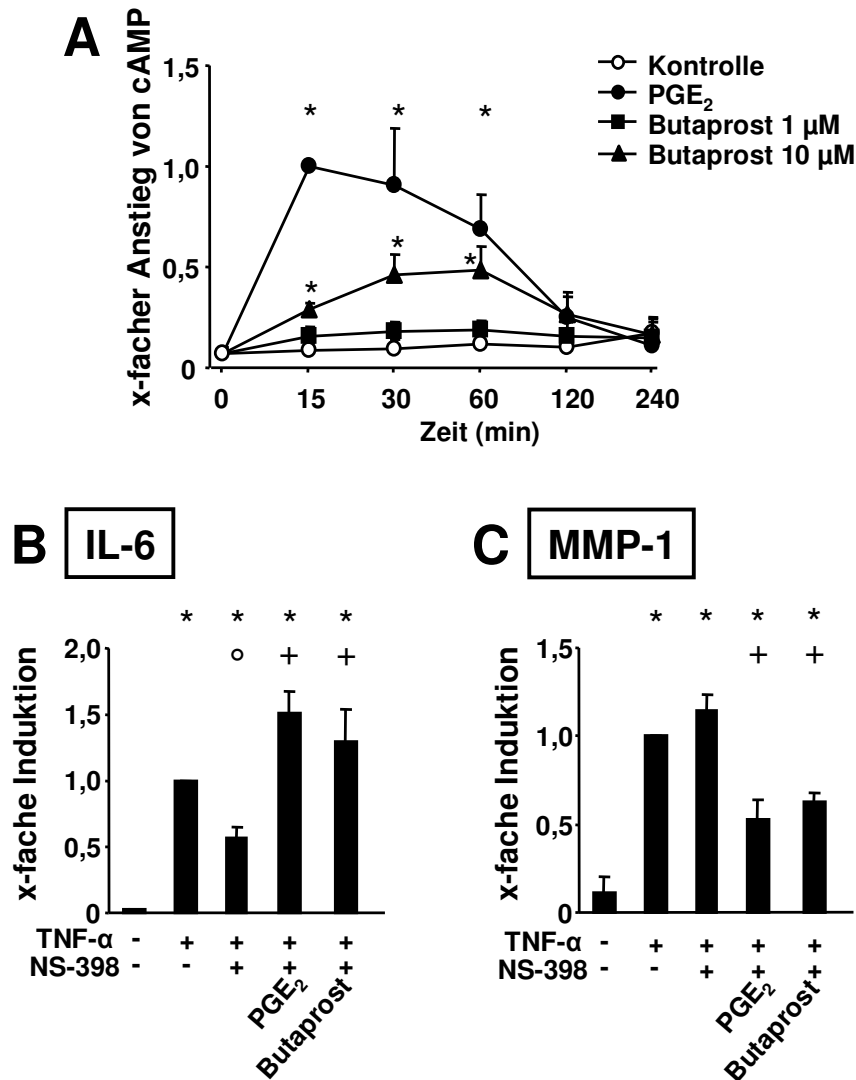


Abbildung 10: Modulierender Einfluss des EP2-Agonisten Butaprost auf die TNF-α-induzierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1

A: RA-SFB wurden für 4 h mit PGE₂, Butaprost 1 μM oder Butaprost 10 μM stimuliert. Die cAMP-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven EIA Kits bestimmt.

B-F: RA-SFB wurden für 24 h mit TNF-α mit/ohne NS-398-Präinkubation bzw. PGE₂ oder Butaprost (jeweils 1 μM) stimuliert. Aufgetragen ist der Mittelwert mit Standardfehler.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

° Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF-α

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF-α/ NS-398

5.7 Stimulation der cAMP-Bildung durch selektive EP-Agonisten

Die Stimulierung der RA-SFB mit PGE₂ oder einem selektiven EP-Rezeptor-Agonisten führte zu einem deutlichen Anstieg von cAMP (PGE₂: Anstieg um das 140-fache bzw. EP2-Rezeptor-Agonist: Anstieg um das 20-fache; Abb. 11). Die

Stimulierung mit einem EP1-, EP3- oder EP4-Rezeptor-Agonisten bewirkte jedoch keinen cAMP-Anstieg.

Die Präinkubation mit IBMX führt unter Stimulierung mit PGE₂ zu einem 230-fachen Anstieg von cAMP (s. Abb. 18 im Anhang). Auch die cAMP-Aktivität nach Stimulierung mit dem EP2-Rezeptor-Agonisten wurde durch Präinkubation mit IBMX deutlich gesteigert (80-facher Anstieg, s. Abb. 18 im Anhang).

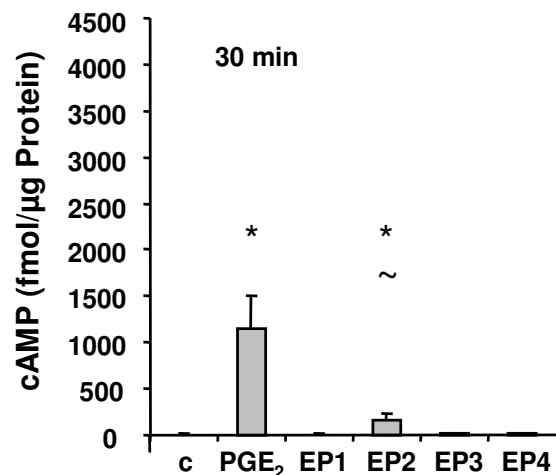


Abbildung 11: Induktion der cAMP-Bildung durch selektive EP-Agonisten

RA-SFB (n=5) wurden für 30 min mit PGE₂ oder jeweils einem EP-Rezeptor-Agonisten (10 μM) stimuliert. Die cAMP-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven EIA Kits bestimmt. Angegeben ist die cAMP-Konzentration in fmol/μg Protein. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

~ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu PGE₂

5.7.1 Modulation der TNF- α -induzierten mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1 durch PGE₂ und selektive EP-Agonisten

Wie in den vorangegangenen Experimenten (s. Abb. 5 und 6) steigert die Zugabe von PGE₂ zu TNF- α -stimulierten und mit NS-398 präinkubierten RA-SFB die mRNA-Expression von IL-6 deutlich und signifikant (3,3-facher Anstieg im Vergleich zu TNF- α /NS-398; Abb. 12B). Auch der EP2-Agonist steigert die mRNA-Expression, allerdings nicht ganz so stark wie PGE₂ (2,7-facher Anstieg). Die selektiven EP-Rezeptor-Agonisten für EP3 und EP4 bewirken ebenfalls einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von IL-6 (1,7-fach bzw. 1,9-fach; Abb. 12B).

PGE₂ senkt dagegen die mRNA-Expression von MMP-1 in TNF- α -stimulierten und mit NS-398 präinkubierten RA-SFB signifikant um 60% (Abb. 12C). Während die EP1-, EP3- und EP4-Agonisten keinen Effekt auf die MMP-1-Expression haben, senkt der EP2-Agonist die Expression von MMP-1 fast genauso effizient wie PGE₂ (Senkung um 55%; Abb. 12C).

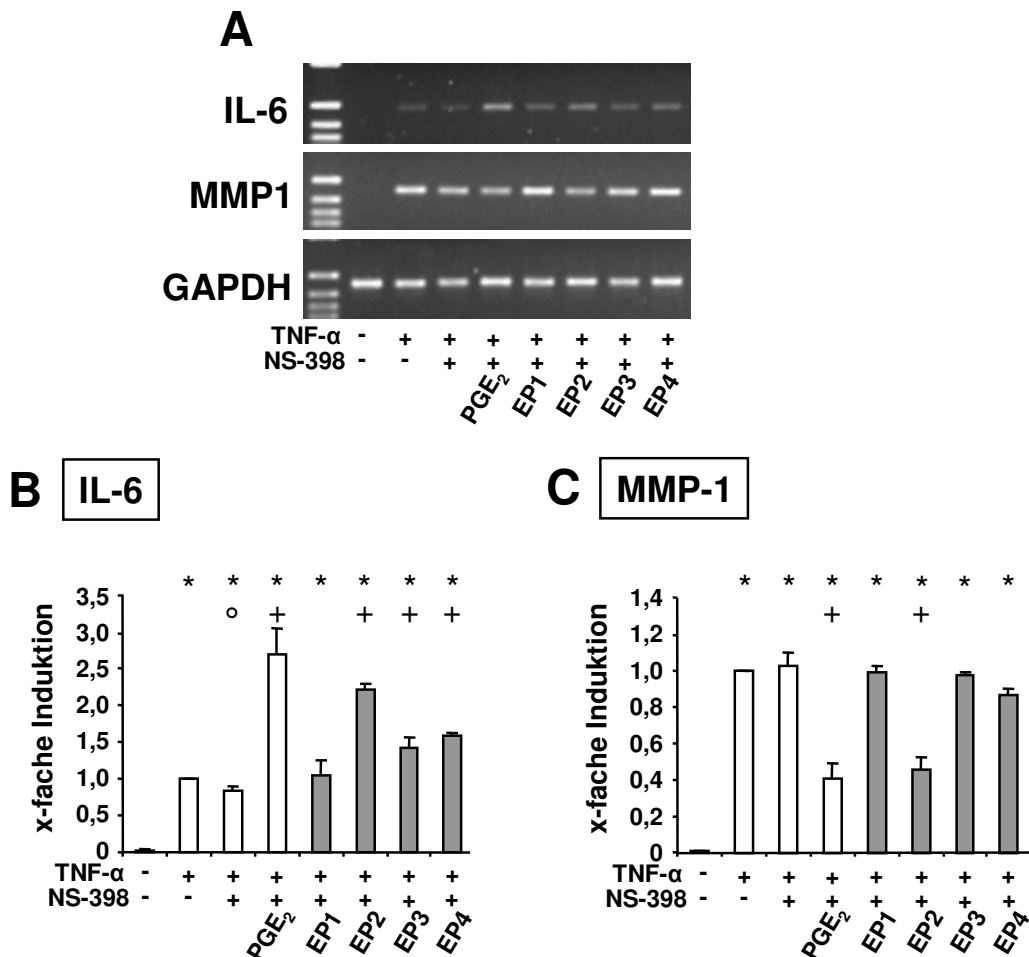


Abbildung 12: Modulation der TNF- α -induzierten mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1 durch PGE₂ und selektive EP-Agonisten

RA-SFB (n=3) wurden für 24 h mit TNF- α mit/ohne NS-398-Präinkubation bzw. PGE₂ oder jeweils einem EP-Rezeptor-Agonisten (10 μ M) stimuliert. Die mRNA-Expression von IL-6 (B) und MMP-1 (C) wurde mit konventioneller PCR bestimmt. Gezeigt sind PCR-Gele eines repräsentativen Patienten (A). Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

° Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α / NS-398

5.8 Auswirkungen des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX auf TNF- α - und PGE₂-stimulierte RA-SFB

Die mRNA-Expression von IL-6 in TNF- α - und PGE₂-stimulierten und mit NS-398-präinkubierten RA-SFB wird durch eine Präinkubation mit IBMX nicht verändert (Abb. 13A). Dies spricht für eine cAMP-unabhängige Signaltransduktion der Wirkungen von PGE₂ auf die IL-6-Expression.

Im Gegensatz dazu senkt die Präinkubation mit IBMX die mRNA-Expression von MMP-1 in TNF- α - und PGE₂-stimulierten und mit NS-398-präinkubierten RA-SFB um weitere 60% (Abb. 13C). Dies spricht für eine cAMP-abhängige Signaltransduktion der Wirkungen von PGE₂ auf die MMP-1-Expression.

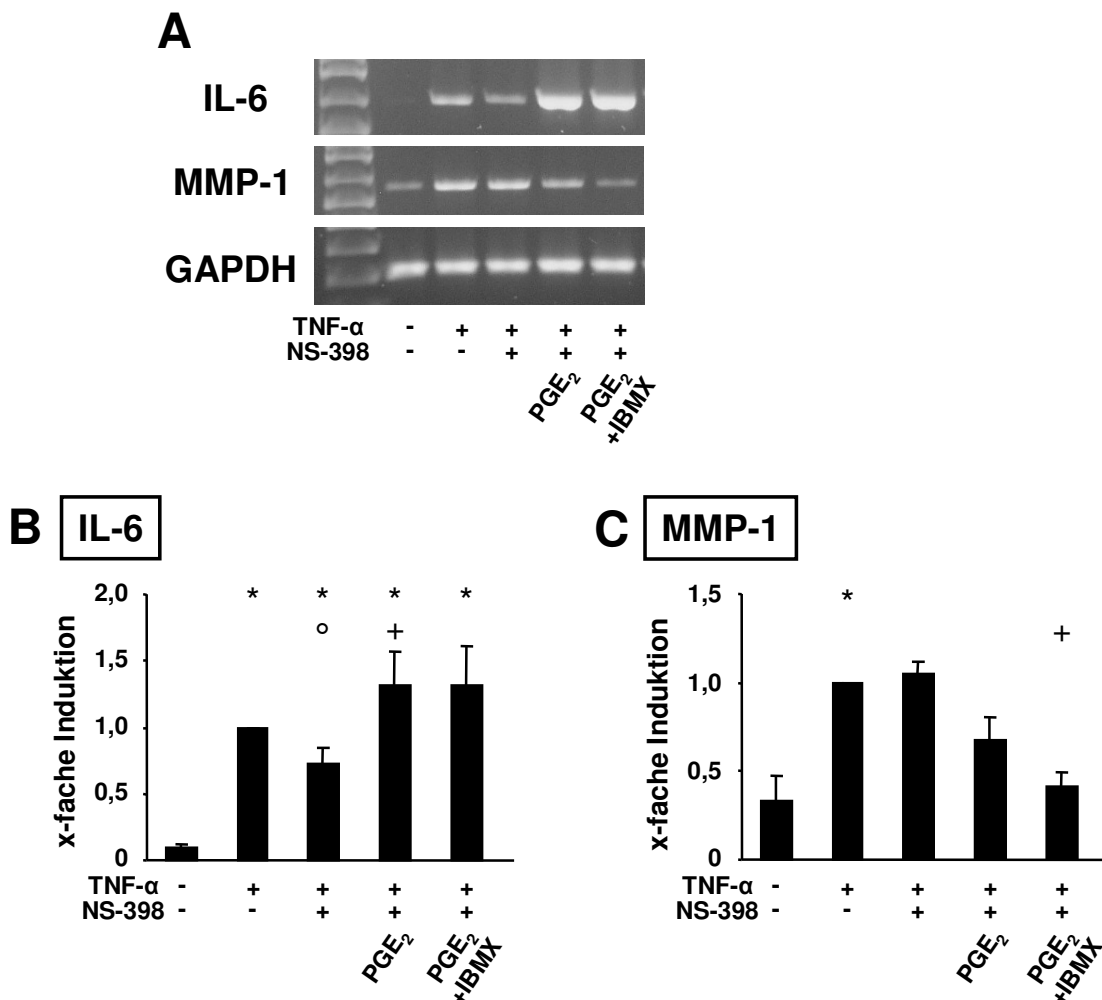


Abbildung 13: Auswirkungen des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX auf die TNF- α -induzierte und PGE₂-modulierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1

RA-SFB (n=4) wurden für 24 h mit TNF- α und PGE₂ mit/ohne Präinkubation mit NS-398 bzw. IBMX (100 μ M) stimuliert (B, C). Die mRNA-Expression von IL-6 (B) und MMP-1 (C)

wurde mit konventioneller PCR bestimmt. Gezeigt sind PCR-Gele eines repräsentativen Patienten (A). Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler.

- * Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle
- ° Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α
- + Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF- α / NS-398

5.9 Identifikation von potenziell relevanten Transkriptionsfaktoren für die Modulation der funktionellen Effekte von TNF- α durch PGE₂

Aufgrund der differenziellen Regulation von IL-6 und MMP-13 einerseits (Hochregulation durch PGE₂ in TNF- α -stimulierten RA-SFB) und MMP-1, CCL2 und IL-8 andererseits (Herunterregulation durch PGE₂ in TNF- α -stimulierten RA-SFB) wurden weiterführende bioinformatische Analysen zu den potenziell involvierten Regulatoren/Transkriptionsfaktoren (TF) durchgeführt. Die Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Michael Weber, Hans-Knöll-Institut, Jena, durchgeführt.

Die Analyse/Vorhersage von möglichen TF-Bindungsstellen mit dem Programm Pscan, welches bekannte Bindestellenmotive aus den Datenbanken Transfac und Jaspar verwendet (Zambelli F et al. 2009), ergab für IL-6 alleine bzw. für die Kombination von IL-6 und MMP-13 insgesamt 6 verschiedene mögliche TF (Tab. 10 und 11). Weitere Analysen z.B. des TF TCF11:MAFG wären nun nötig, um eventuell dessen Einfluss auf die Genregulation von IL-6 und MMP-13 zu belegen.

Tab. 10: Zusammenfassung der mit dem Programm Pscan vorhergesagten Transkriptionsfaktoren

Gene set	Transfac	Jaspar
IL6	C/EBPalpha; C/EBPbeta; p53; Pax-6	C/EBPalpha; MZF-1; Pax-6
IL6-MMP13	TCF11:MAFG	-
IL8-CCL2-MMP1	-	-

Tab. 11: Details der vorhergesagten Transkriptionsfaktoren

Transkriptions- faktor	Gen	Gensymbol
C/EBPalpha	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	CEBPA
C/EBPbeta	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB
p53	tumor protein p53	TP53
Pax-6	paired box 6	PAX6
MZF-1	myeloid zinc finger 1	MZF1
TCF11:MAFG	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	NFE2L1 (TCF11)

Pathway Studio[®] beinhaltet eine Datenbank, die verschiedene Arten von Interaktionen zwischen Zellkomponenten wie z.B. Proteinen speichert (Yuryev et al. 2006). Dieses Interaktionswissen wurde mithilfe eines speziellen Textalgorithmus automatisch aus wissenschaftlicher Literatur extrahiert. Unter Nutzung des Programms Pathway Studio[®] wurde versucht, Hinweise auf Moleküle zu erhalten, die mit den einzelnen Mitgliedern der oben angeführten Genkomplexe Interaktionen aufweisen (Resultate in Abb. 14, Auflistung aller gefundenen TF in Tab.12 im Anhang).

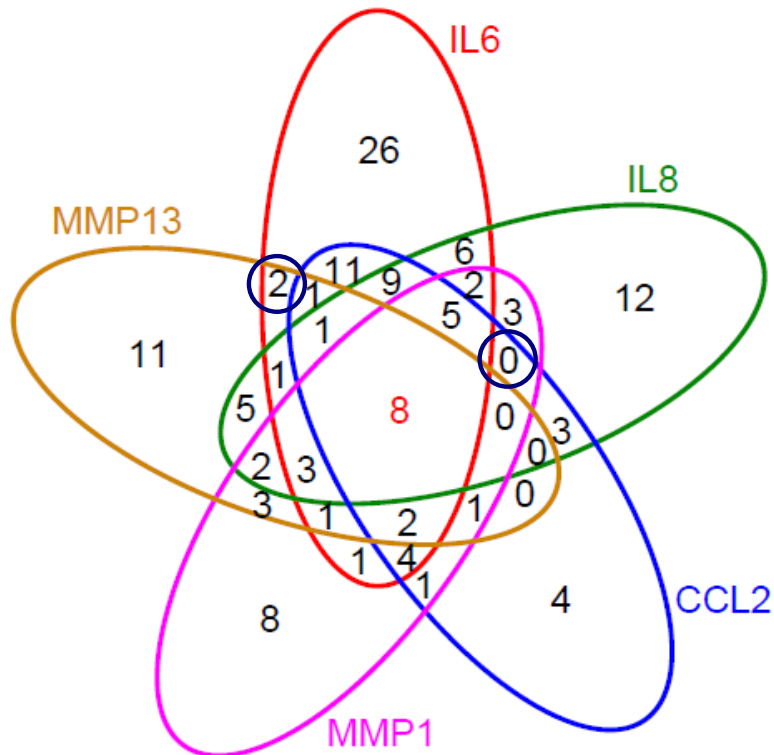


Abbildung 14: Ergebnisse der Suche mit Pathway Studio®

Gezeigt ist ein Venn-Diagramm, das das Ergebnis der Suche nach TF-Zielgen Interaktionen mittels Pathway Studio® darstellt. Die Schnittmengen geben die Anzahl der gefundenen TF für das jeweilige Zielgen an. Dunkelblau umrahmt ist außerdem die spezifische Schnittmenge von IL-6 und MMP-13; diese haben z.B. zwei gemeinsame TF (RUNX1 und SMAD2), die nicht an der Regulation von MMP-1, CCL2 und IL-8 beteiligt sind. Dagegen gibt es keinen TF, der spezifisch MMP-1, CCL2 und IL-8, aber nicht IL-6 und MMP-1 reguliert (zweiter dunkelblauer Kreis um eine 0).

Es wurden zwei TF (RUNX1, SMAD2) gefunden, die spezifisch an der Regulation der ersten Gengruppe (IL-6, MMP-13), aber nicht an der Regulation von einem oder mehreren der Gene MMP-1, CCL2 und IL-8 beteiligt sind. Diese TF könnten einen Einfluss auf die differenzielle Regulierung von IL-6 und MMP-13 versus IL-8, CCL2 und MMP-1 haben. Weitere Untersuchungen dieser beiden TF sind nötig, um deren spezielle Rolle bei der differenziellen Modulation, der TNF- α -induzierten IL-6- und MMP-1-Expression in RA-SFB durch PGE₂ zu erforschen.

Drei TF (C/EBPalpha, C/EBPbeta und p53) wurden sowohl in der Bindestellenanalyse mit Pscan als auch mit dem Literaturrechercheprogramm Pathway Studio® gefunden. Es gibt somit eine Überlappung der Ergebnisse, die eine

Auswahl der in Zukunft weiter zu untersuchenden TF vereinfacht. Diese TF könnten bspw. in einer Gruppe (IL-6 oder MMP-13) stimulierend und in einzelnen Genen der anderen Gruppe (IL-8, CCL2 oder MMP-1) inhibierend wirken.

Durch weitere Analysen wurde allerdings eine Verbindung zwischen den EP-Rezeptoren 2 und 4 (Gensymbol PTGER2 und PTGER4) und catenin-b (Gensymbol CTNNB1; spezifisch für die Interaktion mit IL-8-CCL2-MMP-1) entdeckt; catenin-b ist zwar kein TF für eines dieser Gene, könnte aber indirekt an der Genregulation beteiligt sein.

Tatsächlich wurde gezeigt, dass in Tumorzellen im Falle einer lokal erhöhten Konzentration von PGE₂ über den EP2-Rezeptor und eine Reihe von Folgeschritten catenin-b stabilisiert wird und zur Genexpression von tumorrelevanten Proteinen beitragen kann (Castellone MD et al. 2005). Es ist daher denkbar, dass catenin-b auch eine Rolle bei der differenziellen Regulation der oben angeführten Gene (IL-6 und MMP-1) in TNF- α -stimulierten und mit PGE₂ inkubierten RA-SFB spielt. Diese Befunde könnten als Basis für zukünftige, weiterführende Experimente (z.B. mit siRNA) dienen.

6 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Regulation der pro-inflammatorischen / pro-destruktiven Funktionen von TNF- α -stimulierten RA-SFB durch PGE₂ untersucht werden. Dabei wurde gezeigt, dass 1) TNF- α sowohl pro-inflammatorische (IL-6) als auch pro-destruktive (MMP-1) Funktionen in RA-SFB induziert; 2) PGE₂ diese Funktionen differenziell reguliert; 3) die cAMP-Signaltransduktion dabei eine differenzielle Rolle spielt und 4) diese Effekte v.a. über den PGE₂-Rezeptor EP2 (MMP-1/IL-6), z.T. aber auch über EP3 und EP4 (IL-6) mediiert werden. Diese Ergebnisse bzw. Signalwege (Abb. 15) sind für das pathogenetische Verständnis der RA von großer Bedeutung.

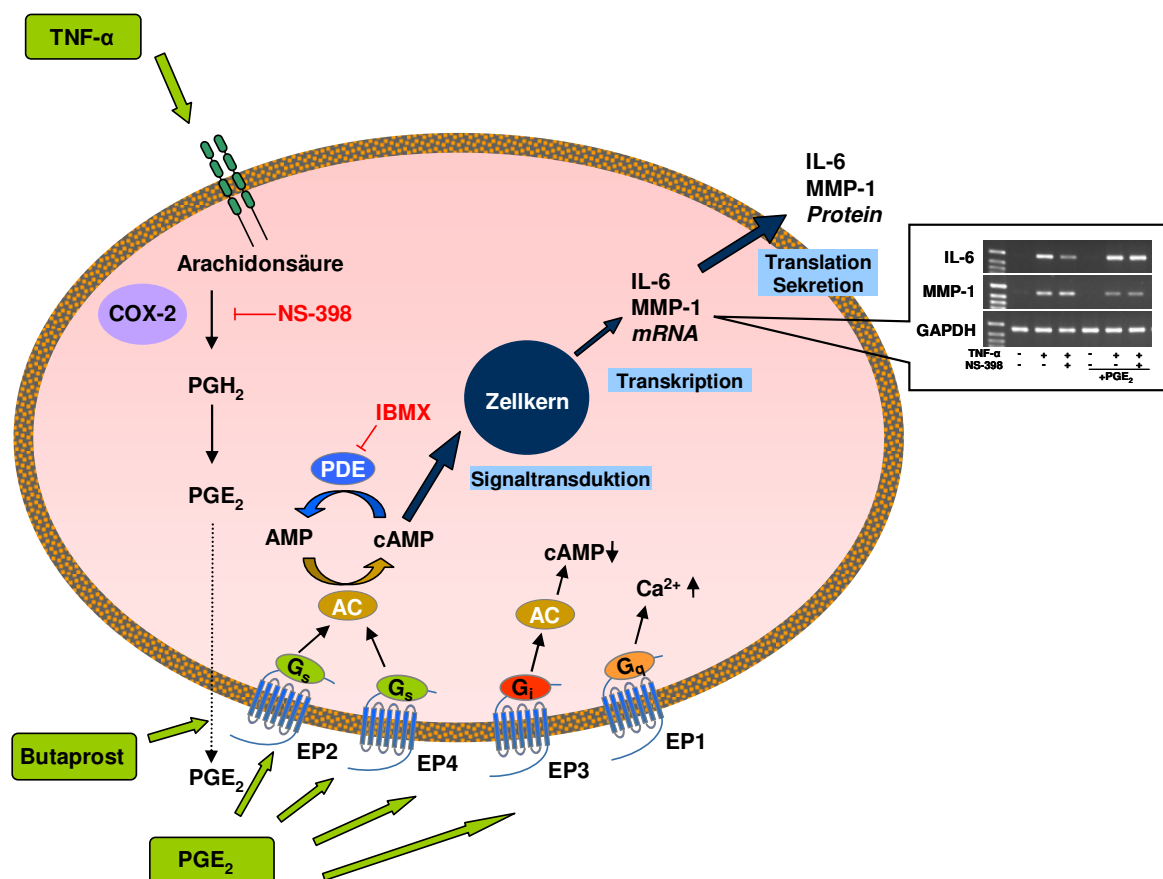


Abbildung 15: Arbeitskonzept

Dargestellt sind die Signalwege in RA-SFB nach Stimulierung mit TNF- α und PGE₂ oder Butaprost sowie repräsentative Einzelergebnisse. COX: Cyclooxygenase; AC: Adenylatzyklase; PDE: Phosphodiesterase; IBMX: Isobutyl-Methylxanthin

6.1 Induktion pro-inflammatorischer und pro-destruktiver Eigenschaften durch TNF- α

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, dass RA-SFB nach Stimulierung mit TNF- α vermehrt pro-inflammatorisches IL-6 und pro-destruktives MMP-1 synthetisieren. Dieser Nachweis gelang auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene.

Diese Befunde bestätigen bisherige Arbeiten, die nach Stimulation von RA-SFB mit vergleichbaren Mengen von TNF- α ebenfalls von einer vermehrten Produktion von IL-6 berichten (Alsalameh S et al. 2003; Westra J et al. 2004). Interessanterweise wurden ähnliche Effekte auch nach Stimulation der RA-SFB mit IL-1 β (Inoue H et al. 2002), einem weiteren Schlüsselmediator der Arthritis in der RA bzw. nach der Stimulation mit der Kombination von TNF- α und IL-1 β (Westra J et al. 2004) beobachtet. Allerdings werden von den beiden Mediatoren TNF- α und IL-1 β unterschiedliche post-Rezeptor Signalwege benutzt (Gabay C et al. 2010; Wang J et al. 2006).

Publizierte *in vitro* Experimente mit RA-SFB haben außerdem gezeigt, dass MMP-1 nach Stimulierung mit IL-1 β (DiBattista JA et al. 1995) und TNF- α (Alsalameh S et al. 2003; Westra J et al. 2004) vermehrt produziert wird. Eine vermehrte mRNA-Expression für MMP-1 nach Stimulierung mit TNF- α wurde auch anhand von Fibroblasten aus gesundem peridontalem Bindegewebe gezeigt – ein Hinweis darauf, dass diese Effekte nicht auf entzündlich veränderte Fibroblasten beschränkt sind, sondern auch in peridontalen Fibroblasten aus gesunden Spendern beobachtet werden können (Nishikawa M et al. 2002).

Daneben wurde in dieser Arbeit die Induktion des klassischen pro-inflammatorisch wirksamen Mediators PGE₂ im zeitlichen Verlauf nach Stimulierung mit TNF- α in RA-SFB gezeigt. Vorarbeiten dazu wurden bereits in der eigenen Arbeitsgruppe angefertigt und publiziert (Alsalameh S et al. 2003). Auch in IL-1 β -stimulierten RA-SFB wurde eine Induktion der PGE₂-Produktion beobachtet (Kojima F et al. 2003).

In den dargestellten Ergebnissen wurde nach 24 h Stimulation im Zellkulturüberstand eine Konzentration von 6 nM (2 ng/ml) PGE₂ erreicht. *In vivo* wird eine PGE₂-

Konzentration von 887 +/- 85 pg/ml in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten beschrieben (Egg D 1984). In der Planung der Experimente entschied sich unsere Arbeitsgruppe dennoch dafür, die Stimulierungen mit der in der Literatur üblichen Konzentration von 1 µM (352,5 ng/ml) durchzuführen; diese Konzentration ist zwar deutlich höher als die Konzentration in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten, erleichtert aber den Vergleich mit bereits publizierten Arbeiten zu den Effekten von PGE₂ auf SFB.

6.2 Differenzielle Regulation von IL-6 und MMP-1 in RA-SFB durch PGE₂

Interessanterweise erhöhte PGE₂ die mRNA-Expression und Proteinsekretion von IL-6 in TNF-α-stimulierten RA-SFB, während es die Sekretion und mRNA-Expression von MMP-1 inhibierte (vgl. Abb. 5 und 6).

Während bisher keine vergleichbaren Daten in TNF-α-stimulierten RA-SFB vorliegen, zeigen Experimente mit IL-1β-stimulierten SFB ebenfalls eine Erhöhung der IL-6 mRNA-Expression durch PGE₂ und damit übereinstimmend eine Verminderung der IL-6 mRNA-Expression durch Zugabe des COX-2-Inhibitors NS-398 (Inoue H et al. 2002).

Im Gegensatz dazu wurde von anderen Autoren gezeigt, dass PGE₂ die IL-6-Sekretion in IL-1α-stimulierten Fibroblasten des peridontalen Bindegewebes gesunder Spender herunterreguliert (Noguchi K et al. 2005). Hier wurden allerdings im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit Zellen aus nicht-entzündlich verändertem Gewebe stimuliert, was möglicherweise auf eine differenzielle Rolle von PGE₂ in entzündetem Gewebe vs. gesundem Gewebe hindeutet.

Auch bezüglich der Effekte von PGE₂ auf MMP-1 liegen bisher nur Daten von IL-1β-stimulierten RA-SFB vor. Dabei wurde in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit eine Inhibierung der MMP-1 mRNA-Expression und Sekretion durch PGE₂ beobachtet (DiBattista JA et al. 1994; DiBattista JA et al. 1995). Andere Autoren stimulierten Kaninchen SFB gleichzeitig mit TNF-α und IL-1β. Dabei führte die Zugabe von PGE₂ ebenfalls zu einer verminderten Sekretion von MMP-1 (Pillinger MH et al. 2003).

Nishikawa et al. zeigten in peridontalen Fibroblasten einen inhibierenden Effekt von PGE₂ auf die MMP-13-, nicht jedoch auf die MMP-1-Expression. Er äußerte daher die Vermutung, dass in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedliche MMPs von PGE₂ reguliert werden (Nishikawa M et al. 2002; Noguchi K et al. 2005; Ruwanpura SMPM et al. 2004).

Die Regulation von MMP-1 durch PGE₂ legt nahe, dass PGE₂ als negativer Feedback-Regulator in der Signalkette wirkt, die eine TNF- α -Stimulation mit der MMP-1-Produktion verbindet. Ob bei diesem Signalweg die Phosphorylierung von p53 oder die Expression von NURR1 bzw. die Inhibierung von Erk und NF- κ B Aktivierung durch PGE₂, die bereits im Zusammenhang mit dem IL-1 β /TNF- α Signalweg beschrieben wurde (Pillinger MH et al. 2003), eine Rolle spielt, muss weiter erforscht werden.

PGE₂ könnte also als negativer Feedback-Regulator der übermäßigen, durch die inflammatorische Umgebung ausgelösten MMP-1-Produktion entgegenwirken. Dies müsste langfristig zu einem hemmenden Effekt auf die fortschreitende Gelenkdestruktion der RA-Patienten führen. Umgekehrt hemmen die weitverbreiteten COX-Hemmer bzw. NSAR die PGE₂-Produktion, mit einem möglichen verstärkenden Effekt auf die Gelenkdestruktion. Tatsächlich wird diese Hypothese durch Studien aus der klinischen Forschung bestätigt. Die radiologisch gemessene Progression der Gelenkdestruktion konnte durch NSAR oder selektive COX-2-Hemmer zumindest nicht aufgehalten werden (Scott DL et al. 2010). Außerdem wurde in den Therapierichtlinien der ACR von 2002 noch die Anwendung eines NSAR oder COX-2-Hemmers in Kombination mit einem DMARD empfohlen (American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines 2002), während diese Empfehlungen in den aktuellen Richtlinien von 2010 nicht mehr enthalten sind (Smolen JS et al. 2010).

6.3 Differenzielle Regulation von IL-8, CCL2 und MMP-13 durch PGE₂

Neben IL-6 und MMP-1 wurden im gleichen experimentellen Ansatz auch andere Chemokine / MMPs bezüglich ihrer Regulation durch PGE₂ in TNF- α -stimulierten RA-SFB untersucht. PGE₂ bewirkte eine Reduktion der TNF- α -induzierten mRNA-

Expression von IL-8 und CCL2 (MCP-1), während die TNF- α -induzierte Expression von MMP-13 durch PGE₂ stimuliert wurde (besonders deutlich beim Einsatz des COX-2-Inhibitors NS-398 erkennbar; vgl. Abb. 7).

Diese Daten wurden in der aktuellen Arbeit erstmals erhoben. In der einzigen zur IL-8-Expression verfügbaren Publikation wurden zwar im Vergleich zu dieser Arbeit gegenläufige Effekte von PGE₂ beobachtet, allerdings ist die Arbeit aufgrund der Spezies (Kaninchen), dem Modell (antigeninduzierte Arthritis) und der eingesetzten COX-Inhibitoren mit unserer Arbeit nicht vergleichbar (Lopez-Armada MJ et al. 2002). Dagegen zeigte die Arbeit von Largo et al. in Übereinstimmung mit der aktuellen Arbeit in IL-1 β -stimulierten Kaninchen SFB eine Steigerung der Expression von CCL2 durch die Zugabe eines nicht-selektiven COX-Inhibitors [Diclofenac oder Meloxicam; (Largo R et al. 2004)]; die Zugabe von PGE₂ hob diesen Effekt wieder auf. Abgesehen von der Speziesdifferenz stellen diese Daten also eine gute Bestätigung unserer Resultate in einem *in vitro* Experiment dar und unterstreichen die Bedeutung von PGE₂ als negativer Feedback-Regulator der CCL2 Regulation, möglicherweise unabhängig von der eingesetzten Spezies und dem zur Stimulierung verwendeten Zytokin.

Bezüglich der Effekte von PGE₂ auf die Expression von MMP-13 wurde im Widerspruch zur vorliegenden Arbeit in Fibroblasten aus peridontalem Bindegewebe nach Präinkubation mit NS-398 und Stimulierung mit TNF- α eine erhöhte Expression von MMP-13 gefunden; die Zugabe von PGE₂ hob diesen Effekt dann auf und supprimierte die MMP-13-Expression (Nishikawa M et al. 2002). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine andere japanische Gruppe, die Fibroblasten aus peridontalen Bindegewebe mit IL-1 α stimulierte und mit Indometacin (nicht-selektives NSAR) oder NS-398 präinkubierte. Auch hier steigerte die Präinkubation mit den COX-Inhibitoren die MMP-13 mRNA-Expression und die Zugabe von PGE₂ hemmte die MMP-13 mRNA-Expression (Noguchi K et al. 2005). Allerdings muss gesagt werden, dass die in beiden Arbeiten verwendeten peridontalen Fibroblasten erstens von einem anderen Ort im Körper stammten und außerdem aus gesundem, d.h. nicht entzündlich verändertem Gewebe isoliert wurden.

6.4 Aktivierung der cAMP-Signalkaskade durch TNF- α und PGE₂

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass eine Stimulierung von RA-SFB mit TNF- α eine erhöhte Produktion von intrazellulärem cAMP induziert (vg. Abb. 8A) und zudem die Proteinkinase (PK) A-Aktivität erhöht (Kunisch E et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für IL-1 β -stimulierte RA-SFB publiziert (Case JP et al. 1990), ein Hinweis darauf, dass das cAMP-System einen kritischen regulatorischen Signalweg in RA-SFB darstellt.

Eine Beteiligung von Prostaglandinen an der TNF- α -induzierten cAMP-Erhöhung ist sehr wahrscheinlich, da Daten aus bereits publizierten Arbeiten (Case JP et al. 1990; Kojima F et al. 2009) und der vorliegenden Arbeit (vgl. Abb. 8C) eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP in RA-SFB nach Stimulierung mit PGE₂ zeigen.

Im Gegensatz zu den langsamen Effekten von TNF- α trat eine PGE₂-induzierte Erhöhung von cAMP bereits 15 min nach der Stimulierung ein. Diese zeitliche Differenz kann durch die verzögerte Bildung von PGE₂ nach TNF- α -Stimulierung erklärt werden [(Case JP et al. 1990); vgl. Abb. 8B]. cAMP könnte wiederum direkt an einem weiteren Anstieg der PGE₂-Bildung in RA-SFB beteiligt sein (Baker DG et al. 1985; Kojima F et al. 2003). Gleichzeitig mit dem intrazellulären cAMP-Anstieg induzierte TNF- α auch die Phosphorylierung von PKA Substraten in RA-SFB, und zwar in strenger Abhängigkeit von der COX-2-Aktivität (Kunisch E et al. 2009). Dies weist darauf hin, dass die cAMP-Erhöhung direkt in ein PKA Signal umgewandelt wurde und etabliert die PKA als Zielmolekül von TNF- α (und PGE₂) in RA-SFB – ein Befund, der bisher nur durch die Anwendung von pharmakologischen Inhibitoren (H89) oder Aktivatoren (Rp-cAMP) (DiBattista JA et al. 1995; Takeba Y et al. 2000) belegt wurde.

6.5 cAMP-Abhängigkeit der Effekte von PGE₂ auf die TNF- α -induzierte MMP-1-Expression (aber nicht auf die IL-6-Expression)

Um eine eventuelle Abhängigkeit dieser funktionellen Parameter von cAMP genauer zu analysieren, wurde der PDE-Inhibitor IBMX eingesetzt, der einen deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration induzierte (vgl. Abb 8D); dies in gutem Einklang mit anderen Literaturbefunden in RA-SFB (Kojima F et al. 2009).

Die Unterdrückung der TNF- α -induzierten MMP-1-Expression durch PGE₂ wurde via cAMP vermittelt. Die cAMP-Erhöhung könnte daher eine Teilspezifität für die anti-destruktiven Eigenschaften von PGE₂ aufweisen, da Phosphodiesterase (PDE) IV-Inhibitoren den Gelenkschaden in Arthritismodellen (McCann FE et al. 2010; Ross SE et al. 1997) oder in der RA (Maksymowych WP et al. 1995) durch Erhöhung der cAMP-Konzentration reduzieren. Eine cAMP-abhängige Regulation von MMP-1 wurde bereits nach Stimulierung von RA-SFB mit IL-1 β gezeigt (DiBattista JA et al. 1995), was darauf hindeutet, dass diese beiden pro-inflammatorischen Schlüsselzytokine zum Teil gleiche post-Rezeptor Signalwege benutzen.

Die fehlende Wirkung einer cAMP-Erhöhung auf die TNF- α -induzierte IL-6-Expression legt die Beteiligung von anderen Signalwegen nahe. Tatsächlich wurden cAMP-unabhängige Signalwege (PI3K/Erk) für den EP4-Rezeptor beschrieben (Fujino H et al. 2002). Alternativ könnte die IL-6-Expression auch nur in Anwesenheit von sehr hohen (ca. 10.000-fach über den hier gemessenen) intrazellulären cAMP-Konzentrationen cAMP-abhängig reguliert werden (Dendorfer U et al. 1994).

In Widerspruch zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen mit TNF- α , beschrieb Inoue et al, dass zur Regulation der IL-1 β -induzierten IL-6-Expression cAMP-abhängige Signalwege benutzt werden (Inoue H et al. 2002). Dies könnte auf eine spezifische und differenzielle Regulation der IL-6-Expression durch unterschiedliche pro-inflammatorische Zytokine unterhalb der Rezeptorebene hinweisen. Allerdings benutzte Inoue OA-SFB, die evtl. einen weniger aktivierten Phänotyp aufweisen und damit nur begrenzt mit RA-SFB vergleichbar sind.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der Einsatz eines PDE-Inhibitors die MMP-1-Konzentration senkt und damit anti-destruktive Eigenschaften hat, könnte der Einsatz von PDE-Inhibitoren mit einer nachfolgenden cAMP-Erhöhung einen therapeutischen Ansatz in der Behandlung der RA darstellen. Die IL-6-Konzentration würde in diesem therapeutischen Ansatz idealerweise unberührt bleiben, da ihre Regulation cAMP-unabhängig ist. Tatsächlich wird dieser Ansatz zur Therapie der RA in der aktuellen Forschung bereits verfolgt (McCann FE et al. 2010).

Interessante Neuentwicklungen zur spezifischen Hemmung von Subtypen der PDE (z.B. PDE-4 und -7) bieten dabei die Perspektive einer selektiveren und eventuell nebenwirkungsärmeren Therapie (Crilly A et al. 2011; Yamamoto S et al. 2007); eine Phase II Studie zur Behandlung der Psoriasis Arthritis mit einem oral verfügbaren PDE-4-Inhibitor wurde bereits erfolgreich abgeschlossen (Schett G et al. 2012).

6.6 Differenzielle Regulation der Expression der EP-Rezeptoren durch TNF- α

Die biologischen Funktionen von PGE₂ werden durch vier membranständige Rezeptoren vermittelt (Narumiya S et al. 1999), die alle bereits in der Literatur auf RA-SFB nachgewiesen wurden (Mathieu MC et al. 2008) und deren Expression in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde (vgl. Abb. 9). In Übereinstimmung mit bereits publizierten Untersuchungen, die auf einer IL-1 β -Stimulierung beruhen, steigerte TNF- α die Expression des EP2- (und zum geringeren Teil auch des EP3-) Rezeptors auf RA-SFB (Inoue H et al. 2002; Mathieu MC et al. 2008). Die Hochregulierung des EP2- und/oder EP3-Rezeptors könnte daher eine allgemeine Antwort der RA-SFB auf pro-inflammatorische Stimuli sein. Im Gegensatz zu bereits publizierten Untersuchungen mit IL-1 β Stimulation (Inoue H et al. 2002) verminderte TNF- α jedoch die Expression des EP4-Rezeptors. Diese Unterschiede könnten auf der Verwendung von verschiedenen Zytokinen zur Stimulierung bzw. auf unterschiedlichen Zellkulturbedingungen beruhen. Die Induktion von an der Synthese von PGE₂ beteiligten Enzymen [COX-2, mPGES-1, (Alaaeddine N et al. 1999; Crofford LJ 1999; Kojima F et al. 2004)] sowie verschiedener EP-Rezeptoren durch pro-inflammatorische Zytokine [(Inoue H et al. 2002; Mathieu MC et al. 2008), vgl. Abb. 9], legt die Vermutung nahe, dass die PGE₂-Signalkaskade gezielt durch pro-inflammatorische Zytokine bzw. durch PGE₂ selbst kontrolliert wird, und zwar nicht nur auf der Ebene der PGE₂-Synthese, sondern auch auf der Ebene der EP-Rezeptor-Expression (Kojima F et al. 2003).

6.7 Differenzielle Modulation der funktionellen Effekte von TNF- α durch individuelle EP-Rezeptoren

Die Induktion des EP2-Rezeptors durch TNF- α deutet auf eine bedeutende Rolle dieses Rezeptors für TNF- α /PGE₂-vermittelte Signale in RA-SFB hin. Dies wurde

durch die EP2-Rezeptor-vermittelte, $\text{TNF-}\alpha/\text{PGE}_2$ -induzierte Erhöhung von intrazellulärem cAMP bzw. die Phosphorylierung von PKA Substraten (Kunisch E et al. 2009) bestätigt, die beim Einsatz von EP3-Agonisten nicht und beim Einsatz von EP4-Agonisten nur unter IBMX-Behandlung sehr abgeschwächt auftrat (Kunisch E et al. 2009); s. auch Abb. 18 im Anhang). Die fehlende Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Sulprostone/EP3-Stimulierung wurde für andere Zelltypen bereits beschrieben (Carbonne B et al. 1996) und ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der EP3-Rezeptor in der Regel mit G_i Proteinen gekoppelt ist. Die im Vergleich zum EP2-Rezeptor schwächere Wirkung des EP4-Rezeptors auf die cAMP-Konzentration wurde ebenfalls bereits beschrieben (Desai S et al. 2000; Mathieu MC et al. 2008). Dies könnte durch eine schnelle Desensibilisierung auf der Basis von Internalisierung oder struktureller Veränderungen des EP4-Rezeptors erklärt werden (Desai S et al. 2000; Nishigaki N et al. 1996).

Die Analyse der mRNA-Expression für pro-inflammatorisches IL-6 und pro-destruktives MMP-1 unterstreicht die dominante Rolle des EP2-Rezeptors (s. Abb. 10, 12). Obwohl die IL-6 mRNA-Expression durch die Stimulierung mit den Agonisten für EP2, EP3 und EP4 erhöht werden konnte, war der maximale, durch den EP2-Agonisten induzierte Anstieg ($>2,5$ -fach) größer als der Anstieg durch die EP3/EP4-Agonisten ($<2,0$ -fach). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Inoue et al (Inoue H et al. 2002), der zeigte, dass die IL-6-Sekretion in IL-1 β -stimulierten RA-SFB durch EP2- oder EP4-Agonisten in gleichem Maße induziert werden konnte. Erklärungen hierfür könnten in dem Einsatz unterschiedlicher pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β vs. $\text{TNF-}\alpha$), verschiedener Konzentrationen der Agonisten (2 nM vs. 10 μM) bzw. einer variablen EP3 mRNA/Protein-Expression zu finden sein (Inoue H et al. 2002). Die selektive Regulation von MMP-1 durch den EP2-Rezeptor ist in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.

Erstaunlicherweise war die cAMP-Bildung nach Stimulierung mit 1 μM Butaprost deutlich geringer als nach Stimulierung mit PGE_2 . Die wesentlich geringere cAMP-Erhöhung durch Butaprost im Vergleich zu PGE_2 wurde auch in einer anderen Arbeit anhand von CHO K1 T-Zellen bestätigt (Wilson RJ et al. 2004). Trotz der geringen cAMP-Induktion durch Butaprost regulierte Butaprost die beschriebenen

Gene ähnlich stark wie PGE₂. Das könnte darauf hindeuten, dass unterschiedliche cAMP-Konzentrationen trotzdem die gleichen funktionellen Effekte haben können, evtl. aufgrund simultan auftretender exzitatorischer und inhibitorischer Wirkungen bei gleichzeitiger Ansteuerung mehrerer EP-Rezeptoren durch PGE₂.

Die dominante Rolle des EP2-Rezeptors in der Regulation von TNF- α -induzierten Funktionen in RA-SFB macht EP2 zu einem aussichtsreichen Zielmolekül in der Therapie der RA. Allerdings sprechen die hier präsentierten Daten dafür, dass dieser Ansatz kritisch betrachtet werden sollte. Gerade die gegensätzlichen Wirkungen der PGE₂/EP2-Signalkette auf die TNF- α -induzierte IL-6 bzw. MMP-1 mRNA-Expression legen nahe, dass eine therapeutische EP2-Blockade zwar anti-inflammatorisch, aber andererseits pro-destruktiv wirken könnte. Außerdem macht die Induktion von pro-inflammatorischem IL-6 durch PGE₂ über EP2, EP3 und EP4 die Auswahl eines einzelnen Rezeptors als therapeutisches Zielmolekül schwer bis unmöglich.

Nichtsdestotrotz stellen Ansätze zur spezifischen EP-Rezeptor-Blockade neben Entwicklungen zur Blockade des IP-Rezeptors bzw. weiter distal gelegenen Enzymen der PG-Synthese (z.B. mPGES-1) (Kamei D et al. 2004; Mbalaviele G et al. 2010) innovative therapeutische Ansätze dar.

Zwar spricht die Herunterregulierung von EP4 durch TNF- α für eine weniger bedeutende Rolle von EP4 in RA-SFB. Andererseits haben in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Daten frühere Studien bereits neben EP2 auch einen Einfluss von EP4 auf die IL-6-Sekretion gezeigt (Inoue H et al. 2002). Ebenso legen Ergebnisse aus Chondrozyten (Fushimi K et al. 2007) und Arthritis Modellen in EP4-knock-out Mäusen (McCoy JM et al. 2002) eine wichtige Rolle von EP4 in der Pathogenese der RA nahe. Eine aktuelle Studie zeigte sogar in einem Kollagen-induzierten Arthritis Modell in Ratten eine Reduktion der klinischen Ausprägung der Arthritis und der Progression der Gelenkdestruktion mit einem oral verfügbaren EP4-Antagonisten (Chen Q et al. 2010). Dagegen wurde in einer anderen Veröffentlichung gezeigt, dass die alleinige Inhibierung einzelner EP-Rezeptoren nicht ausreichend für eine Verminderung der klinischen Symptome bei der Kollagen-induzierten Arthritis in Mäusen ist (Honda T et al. 2006). Nur die

kombinierte Hemmung von EP2 und EP4 führte in diesem Modell zu einer verminderten Krankheitsaktivität und IL-6-Konzentration.

Zusammengenommen spricht die hier vorgelegte Arbeit ebenfalls dafür, dass die selektive, ausschließlich lokal auf das Gelenk begrenzte Manipulation des EP2- und EP4-Rezeptors einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie der RA darstellen könnte – ohne die Patienten den kardiovaskulären und gelenkdestruktiven Risiken der COX-Hemmer auszusetzen.

7 Schlussfolgerungen

Zum pathogenetischen Verständnis der RA ist ein Verständnis des Schlüsselmediators PGE_2 mit seinen differenziellen Funktionen essenziell. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb anhand von $\text{TNF-}\alpha$ -stimulierten RA-SFB die Rolle von PGE_2 , seinen vier Rezeptoren und des post-Rezeptor Signalmoleküls cAMP analysiert.

Es zeigte sich dabei, dass PGE_2 in $\text{TNF-}\alpha$ -stimulierten RA-SFB die mRNA-Expression und Proteinsekretion des pro-inflammatorischen Mediators IL-6 erhöhte, während es die mRNA-Expression und Proteinsekretion des pro-destruktiven Mediators MMP-1 senkte. Dies legt nahe, dass PGE_2 in der $\text{TNF}\alpha$ /MMP-1-Signalkette als negativer Feedback-Regulator wirkt und in einer inflammatorischen Umgebung die übermäßige Ausschüttung von gelenkdestruktivem MMP-1 hemmt. Zwei Datenbankanalysen ergaben Hinweise auf Transkriptionsfaktoren (RUNX1, p53 u.a.), die eine Rolle in der Regulation durch PGE_2 spielen könnten und zukünftig weiter erforscht werden sollten. Da die weit verbreiteten COX-Inhibitoren die Bildung von PGE_2 hemmen, könnten sie in der Behandlung der RA daher die fortschreitende Gelenkdestruktion verstärken, und ihr Einsatz sollte deshalb kritisch hinterfragt werden.

Ferner wurde gezeigt, dass die hemmenden Effekte von PGE_2 auf die $\text{TNF-}\alpha$ -induzierte MMP-1-Expression cAMP-abhängig vermittelt werden. Dies könnte eine Erklärung für verschiedene tierexperimentelle Studien bieten, die eine deutliche Hemmung der Gelenkdestruktion durch den Einsatz eines PDE-Inhibitors gezeigt haben. Auch für die Behandlung der RA wäre ein therapeutischer Ansatz mit PDE-Inhibitoren denkbar – die IL-6-Konzentration würde im Idealfall davon unberührt bleiben, da ihre Regulation cAMP-unabhängig ist.

Die Induktion des EP2-Rezeptors durch $\text{TNF-}\alpha$ deutet auf eine besondere Rolle dieses Rezeptors hin. Allerdings werden IL-6 und MMP-1 durch PGE_2 gegensätzlich reguliert, und eine Blockade von EP2 hätte neben einer anti-inflammatorischen auch eine pro-destruktive Wirkung. Zudem sind neben EP2 auch EP3 und EP4 an der Modulation von IL-6 beteiligt. Vielversprechende Ergebnisse wurden dagegen in Experimenten mit arthritischen EP4 knock-out Mäusen erzielt. Ob die Inhibierung einzelner EP-Rezeptoren oder der PGE_2 -Synthase den COX-Inhibitoren überlegen sein könnte, muss in weiteren Studien erforscht werden.

III Literaturverzeichnis

- Akaogi J, Nozaki T, Satoh M, Yamada H 2006. Role of PGE₂ and EP receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and as a novel therapeutic strategy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 6(4):383-394.
- Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J 1999. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E₂ production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. *Arthritis Rheum.*, 42(4):710-718.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 62(9):2569-2581.
- Alexopoulou L, Pasparakis M, Kollias G 1997. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur J Immunol*, 27(10):2588-2592.
- Alsalameh S, Amin RJ, Kunisch E, Jasin HE, Kinne RW 2003. Preferential induction of prodestructive matrix metalloproteinase-1 and proinflammatory interleukin 6 and prostaglandin E₂ in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via tumor necrosis factor receptor-55. *J Rheumatol*, 30(8):1680-1690.
- Alsalameh S, Winter K, Al-Ward R, Wendler J, Kalden JR, Kinne RW 1999. Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers. *Scand J Immunol*, 49(3):278-285.
- American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines 2002. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum*, 46(2):328-346.
- Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP, Yamada H, Boumpas DT 1992. Prostaglandin E₂ and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R alpha gene expression at multiple levels. *J Immunol*, 148(9):2845-2852.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31(3):315-324.
- Baier A, Meineckel I, Gay S, Pap T 2003. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 15(3):274-279.
- Baker DG, Baumgarten DF, Bomalaski JS, Zurier RB 1985. Cyclic adenosine 3'5' monophosphate stimulates prostaglandin E production by human adherent synovial cells. *Prostaglandins*, 30(4):669-682.

- Betz M, Fox BS 1991. Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*, 146(1):108-113.
- Blackburn JS, Liu I, Coon CI, Brinckerhoff CE 2009. A matrix metalloproteinase-1/protease activated receptor-1 signaling axis promotes melanoma invasion and metastasis. *Oncogene*, 28(48):4237-4248.
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A 2005. PAR1 is a matrix metalloproteinase-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, 120(3):303-313.
- Bombara MP, Webb DL, Conrad P, Marlor CW, Sarr T, Ranges GE, Aune TM, Greve JM, Blue ML 1993. Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol*, 54(5):399-406.
- Bombardieri S, Cattani P, Ciabattini G, Di Munno O, Pasero G, Patrono C, Pinca E, Pugliese F 1981. The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis: differential effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol*, 73(4):893-901.
- Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H 1990. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(8):3127-3131.
- Butler DM, Feldmann M, Di Padova F, Brennan FM 1994. p55 and p75 tumor necrosis factor receptors are expressed and mediate common functions in synovial fibroblasts and other fibroblasts. *Eur Cytokine Netw*, 5(5):441-448.
- Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM 1995. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw*, 6(4):225-230.
- Carbonne B, Jannet D, Dallot E, Pannier E, Ferre F, Cabrol D 1996. Synthesis of glycosaminoglycans by human cervical fibroblasts in culture: effects of prostaglandin E₂ and cyclic AMP. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 70(1):101-105.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9):3666-3670.
- Case JP, Lafyatis R, Kumkumian GK, Remmers EF, Wilder RL 1990. IL-1 regulation of transin/stromelysin transcription in rheumatoid synovial fibroblasts appears to involve two antagonistic transduction pathways, an inhibitory, prostaglandin-dependent pathway mediated by cAMP, and a stimulatory, protein kinase C-dependent pathway. *J Immunol*, 145(11):3755-3761.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21):13926-13931.
- Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN 1991. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34(9):1125-1132.
- Chen Q, Muramoto K, Masaaki N, Ding Y, Yang H, Mackey M, Li W, Inoue Y, Ackermann K, Shiota H, Matsumoto I, Spyvee M, Schiller S, Sumida T, Gusovsky F, Lamphier M 2010. A novel

- antagonist of the prostaglandin E₂ EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br J Pharmacol*, 160(2):292-310.
- Crilly A, Robertson SE, Reilly JH, Gracie JA, Lai WQ, Leung BP, Life PF, McInnes IB 2011. Phosphodiesterase 4 (PDE4) regulation of proinflammatory cytokine and chemokine release from rheumatoid synovial membrane. *Ann Rheum Dis*, 70(6):1130-1137.
- Crofford LJ 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*, 49:15-19.
- Crofford LJ 1999. COX-2 in synovial tissues. *Osteoarthritis Cartilage*, 7(4):406-408.
- Dayer JM, Krane SM, Russell RG, Robinson DR 1976. Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(3):945-949.
- Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W 1990. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine*, 2(4):231-237.
- Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA 1994. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol*, 14(7):4443-4454.
- Desai S, April H, Nwaneshiudu C, Ashby B 2000. Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol Pharmacol*, 58(6):1279-1286.
- Dey I, Lejeune M, Chadee K 2006. Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol*, 149(6):611-623.
- DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Fujimoto N, Obata K, Zafarullah M, Pelletier JP 1994. Prostaglandins E₂ and E₁ inhibit cytokine-induced metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest*, 71(2):270-278.
- DiBattista JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K, Martel-Pelletier J 1995. Coordinate regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol Suppl*, 43:123-128.
- Eck SM, Blackburn JS, Schmucker AC, Burrage PS, Brinckerhoff CE 2009. Matrix metalloproteinase and G protein coupled receptors: co-conspirators in the pathogenesis of autoimmune disease and cancer. *J Autoimmun*, 33(3-4):214-221.
- Egeblad M, Werb Z 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2(3):161-174.
- Egg D 1984. Concentrations of prostaglandins D2, E2, F2 alpha, 6-keto-F1 alpha and thromboxane B2 in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and osteoarthritis. *Z Rheumatol*, 43(2):89-96.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H, et al. 1994. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 344(8930):1105-1110.

- Faour WH, Alaaeddine N, Mancini A, He QW, Jovanovic D, Di Battista JA 2005. Early growth response factor-1 mediates prostaglandin E₂-dependent transcriptional suppression of cytokine-induced tumor necrosis factor- α gene expression in human macrophages and rheumatoid arthritis-affected synovial fibroblasts. *J Biol Chem*, 280(10):9536-9546.
- Faour WH, Mancini A, He QW, Di Battista JA 2003. T-cell-derived interleukin-17 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through restricted activation of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade: role of distal sequences in the 3'-untranslated region of COX-2 mRNA. *J Biol Chem*, 278(29):26897-26907.
- Fedyk ER, Phipps RP 1996. Prostaglandin E₂ receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20):10978-10983.
- Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR 1997. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20):10895-10900.
- Fortier MA, Krishnaswamy K, Danyod G, Boucher-Kovalik S, Chapdalaine P 2008. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 1:65-89.
- Fujino H, West KA, Regan JW 2002. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E₂. *J Biol Chem*, 277(4):2614-2619.
- Funk CD 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548):1871-1875.
- Furuhashi I, Abe K, Sato T, Inoue H 2008. Thrombin-stimulated proliferation of cultured human synovial fibroblasts through proteolytic activation of proteinase-activated receptor-1. *J Pharmacol Sci*, 108(1):104-111.
- Fushimi K, Nakashima S, You F, Takigawa M, Shimizu K 2007. Prostaglandin E₂ downregulates TNF- α -induced production of matrix metalloproteinase-1 in HCS-2/8 chondrocytes by inhibiting Raf-1/MEK/ERK cascade through EP4 prostanoid receptor activation. *J Cell Biochem*, 100(3):783-793.
- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 6(4):232-241.
- Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, Marjanovic N, Dave M, Park J, Bingham CO, 3rd, Al-Mussawir H, Abramson SB 2005. Resolution of inflammation: prostaglandin E₂ dissociates nuclear trafficking of individual NF- κ B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol*, 175(10):6924-6930.
- Gravallese EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR 1998. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*, 152(4):943-951.
- Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, Goldring SR 2000. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*, 43(2):250-258.

- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 30(11):1205-1213.
- Grell M, Scheurich P, Meager A, Pfizenmaier K 1993. TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytotoxicity. *Lymphokine Cytokine Res*, 12(3):143-148.
- Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M 1991. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol*, 21(10):2575-2579.
- Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL 1995. Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 54(1):25-32.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4):413-417.
- Hirth A, Skapenko A, Kinne R, Emmrich F, Schulze-Koops H, Sack U 2002. Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4(2):117-125.
- Honda T, Segi-Nishida E, Miyachi Y, Narumiya S 2006. Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E₂-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 203(2):325-335.
- Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J 1988. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*, 31(6):784-788.
- Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY 2004. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF- κ B- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther*, 6(2):R120-128.
- Inoue H, Takamori M, Shimoyama Y, Ishibashi H, Yamamoto S, Koshihara Y 2002. Regulation by PGE₂ of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol*, 136(2):287-295.
- Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol*, 63(1):17-31.
- Jing H, Vassiliou E, Ganea D 2003. Prostaglandin E₂ inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 74(5):868-879.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , by human macrophages. *J Immunol*, 160(7):3513-3521.
- Jüngel A, Ospelt C, Gay S 2010. What can we learn from epigenetics in the year 2009? *Curr Opin Rheumatol*, 22(3):284-292.
- Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML 2001. Prostaglandin E₂ is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, 97(11):3466-3469.

- Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, Yasui H, Azuma Y, Hirasawa N, Ohuchi K, Kawaguchi H, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Murakami M, Kudo I 2004. Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. *J Biol Chem*, 279(32):33684-33695.
- Kinne RW, Boehm S, Iftner T, Aigner T, Vornehm S, Weseloh G, Bravo R, Emmrich F, Kroczeck RA 1995. Synovial fibroblast-like cells strongly express jun-B and C-fos proto-oncogenes in rheumatoid and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol Suppl*, 101:121-125.
- Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R, Portek IJ 2006. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum*, 54(4):1122-1131.
- Kojima F, Kapoor M, Kawai S, Yang L, Aronoff DM, Crofford LJ 2009. Prostaglandin E₂ activates Rap1 via EP2/EP4 receptors and cAMP-signaling in rheumatoid synovial fibroblasts: involvement of Epac1 and PKA. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(1-2):26-33.
- Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S 2004. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 6(4):R355-R365.
- Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Beppu M, Aoki H, Kawai S 2003. Prostaglandin E₂ is an enhancer of interleukin-1 β -induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 48(10):2819-2828.
- Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, Lopez-Otin C, Takagi M 1999. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58(11):691- 697.
- Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S 1996. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res*, 11(1):88-95.
- Kremer JM, Blanco R, Brzosko M, Burgos-Vargas R, Halland AM, Vernon E, Ambis P, Fleischmann R 2011. Tocilizumab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to methotrexate: results from the double-blind treatment phase of a randomized placebocontrolled trial of tocilizumab safety and prevention of structural joint damage at one year. *Arthritis Rheum*, 63(3):609-621.
- Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW 2004. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis*, 63(7):774-784.
- Kunisch E, Gandesiri M, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Kinne RW 2007. Predominant activation of MAP kinases and pro-destructive/pro-inflammatory features by TNF alpha in early-passage synovial fibroblasts via TNF receptor-1: failure of p38 inhibition to suppress matrix metalloproteinase-1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 66(8):1043-1051.
- Kunisch E, Jansen A, Kojima F, Löffler I, Kapoor M, Kawai S, Rubio I, Crofford LJ, Kinne RW 2009. Prostaglandin E₂ differentially modulates proinflammatory/prodestructive effects of TNF-alpha on synovial fibroblasts via specific E prostanoid receptors/cAMP. *J Immunol*, 183(2):1328-1336.

- Largo R, Diez-Ortego I, Sanchez-Pernaute O, Lopez-Armada MJ, Alvarez-Soria MA, Egido J, Herrero-Beaumont G 2004. EP2/EP4 signalling inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production induced by interleukin 1beta in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*, 63(10):1197-1204.
- Legler DF, Bruckner M, Uetz-von Allmen E, Krause P 2010. Prostaglandin E₂ at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(2):198-201.
- Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW 1993. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 36(2):181-189.
- Lopez-Armada MJ, Sanchez-Pernaute O, Largo R, Diez-Ortego I, Palacios I, Egido J, Herrero-Beaumont G 2002. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*, 61(11):1027-1030.
- Makarov SS 2001. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res*, 3(4):200-206.
- Maksymowych WP, Avina-Zubieta A, Luong MH, Russell AS 1995. An open study of pentoxifylline in the treatment of severe refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 22(4):625-629.
- Mathieu MC, Lord-Dufour S, Bernier V, Boie Y, Burch JD, Clark P, Denis D, Han Y, Mortimer JR, Therien AG 2008. Mutual antagonistic relationship between prostaglandin E₂ and IFN-gamma: Implications for rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 38(7):1900-1912.
- Mbalaviele G, Pauley AM, Shaffer AF, Zweifel BS, Mathialagan S, Mnich SJ, Nemirovskiy OV, Carter J, Gierse JK, Wang JL, Vazquez ML, Moore WM, Masferrer JL 2010. Distinction of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) inhibition from cyclooxygenase-2 inhibition in cells using a novel, selective mPGES-1 inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 79(10):1445-1454.
- McCann FE, Palfreeman AC, Andrews M, Perocheau DP, Inglis JJ, Schafer P, Feldmann M, Williams RO, Brennan FM 2010. Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12(3):R107.
- McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP 2002. The role of prostaglandin E₂ receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 110(5):651-658.
- Min SY, Kim WU, Cho ML, Hwang SY, Park SH, Cho CS, Kim JM, Kim HY 2002. Prostaglandin E₂ suppresses nuclear factor-kappaB mediated interleukin 15 production in rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol*, 29(7):1366-1376.
- Mohr W, Beneke G, Mohing W 1975. Proliferation of synovial lining cells and fibroblasts. *Ann Rheum Dis*, 34(3):219-224.
- Mor A, Abramson SB, Pillinger MH 2005. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, 115(2):118-128.
- Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S 2001. Structure and function of synoviocytes. In: W. J. Koopman (Ed.) *Arthritis and Allied Conditions - A Textbook of Rheumatology*. 14th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 243-251.
- Mullis KB 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*, 48(8):579-582.

- Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I 2002. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S39-49.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274(31):21491-21494.
- Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N 2003. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 48(6):1521-1529.
- Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, Narumiya S 1993. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature*, 365(6442):166-170.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*, 79(4):1193-1226.
- Neidel J, Schulze M, Lindschau J 1995. Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*, 44(5):217-221.
- Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A 1996. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol*, 50(4):1031-1037.
- Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y 2002. Effects of TNFalpha and prostaglandin E₂ on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*, 37(3):167-176.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T 2004. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 50(6):1761-1769.
- Noguchi K, Maeda M, Ruwanpura SM, Ishikawa I 2005. Prostaglandin E₂ (PGE₂) downregulates interleukin (IL)-1alpha-induced IL-6 production via EP2/EP4 subtypes of PGE₂ receptors in human periodontal ligament cells. *Oral Dis*, 11(3):157-162.
- Noguchi K, Ruwanpura SM, Yan M, Yoshida N, Ishikawa I 2005. Down-regulation of interleukin-1alpha-induced matrix metalloproteinase-13 expression via EP1 receptors by prostaglandin E₂ in human periodontal ligament cells. *Oral Microbiol.Immunol*, 20(1):56-59.
- Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14):8222-8226.
- Park JY, Pillinger MH, Abramson SB 2006. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clin Immunol*, 119(3):229-240.
- Pierer M, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Brentano F, Wagner U, Hantzschel H, Michel BA, Gay RE, Gay S, Kyburz D 2004. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol*, 172(2):1256-1265.
- Pillinger MH, Dinsell V, Apsel B, Tolani SN, Marjanovic N, Chan ES, Gomez P, Clancy R, Chang LF, Abramson SB 2004. Regulation of metalloproteinases and NF-kappaB activation in rabbit

- synovial fibroblasts via E prostaglandins and Erk: contrasting effects of nabumetone and 6MNA. *Br J Pharmacol*, 142(6):973-982.
- Pillinger MH, Philips MR, Feoktistov A, Weissmann G 1995. Crosstalk in signal transduction via EP receptors: prostaglandin E₁ inhibits chemoattractant-induced mitogen-activated protein kinase activity in human neutrophils. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 23:311-316.
- Pillinger MH, Rosenthal PB, Tolani SN, Apsel B, Dinsell V, Greenberg J, Chan ES, Gomez PF, Abramson SB 2003. Cyclooxygenase-2-derived E prostaglandins down-regulate matrix metalloproteinase-1 expression in fibroblast-like synoviocytes via inhibition of extracellular signalregulated kinase activation. *J Immunol*, 171(11):6080-6089.
- Plenge RM 2009. Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. *Curr Opin Rheumatol*, 21(3):262-271.
- Pohlert D, Huber R, Ukena B, Kinne RW 2006. Expression of platelet-derived growth factors C and D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 54(3):788-794.
- Robak T, Gladalska A, Stepień H 1998. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw*, 9(2):145-154.
- Rooney BK, Silman AJ 1999. Epidemiology of the rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 11(2):91-97.
- Ross SE, Williams RO, Mason LJ, Mauri C, Marinova-Mutafchieva L, Malfait AM, Maini RN, Feldmann M 1997. Suppression of TNF- α expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collageninduced arthritis by rolipram. *J Immunol*, 159(12):6253-6259.
- Rossetti RG, Brathwaite K, Zurier RB 1994. Suppression of acute inflammation with liposome associated prostaglandin E₁. *Prostaglandins*, 48(3):187-195.
- Ruwanpura SMPM, Noguchi K, Ishikawa I 2004. Prostaglandin E₂ Regulates Interleukin-1-induced Matrix Metalloproteinase-3 Production in Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 83(3):260-265.
- Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F 1993. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 13(2):45-51.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA 1988. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487-491.
- Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL 1992. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest*, 89(1):97-108.
- Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G 2000. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43(11):2501-2512.

- Schett G, Wollenhaupt J, Papp K, Joos R, Rodrigues JF, Vessey A, Hu A, Stevens R, de Vlam KL 2012. Oral apremilast in the treatment of active psoriatic arthritis: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*, 64(10):3156-3167.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 376(9746):1094-1108.
- Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M 1999. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine*, 11(4):257-266.
- Shinomiya S, Naraba H, Ueno A, Utsunomiya I, Maruyama T, Ohuchida S, Ushikubi F, Yuki K, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Oh-ishi S 2001. Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I₂ and E₂: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists. *Biochem Pharmacol*, 61(9):1153-1160.
- Silman AJ, Pearson JE 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S265-272.
- Simon LS, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Yu SS, Zhao WW, Geis GS 1999. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 282(20):1921-1928.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 56(3):387-437.
- Singh JA, Beg S, Lopez-Olivo MA 2011. Tocilizumab for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol*, 38(1):10-20.
- Sirum KL, Brinckerhoff CE 1989. Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochemistry*, 28(22):8691-8698.
- Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gorter S, Knevel R, Nam J, Schoels M, Aletaha D, Buch M, Gossec L, Huizinga T, Bijlsma JW, Burmester G, Combe B, Cutolo M, Gabay C, Gomez-Reino J, Kouloumas M, Kvien TK, Martin-Mola E, McInnes I, Pavelka K, van Riel P, Scholte M, Scott DL, Sokka T, Valesini G, van Vollenhoven R, Winthrop KL, Wong J, Zink A, van der Heijde D 2010. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*, 69(6):964-975.
- Smolen JS, Steiner G 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*, 2(6):473-488.
- Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D 2008. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 58(4):1001-1009.
- Sugimoto Y, Narumiya S 2007. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*, 282(16):11613-11617.
- Tak PP, Zvaifler NJ, Green DR, Firestein GS 2000. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunol Today*, 21(2):78-82.

- Takayama K, Garcia-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA, Jr., Libby P 2002. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem*, 277(46):44147-44154.
- Takeba Y, Suzuki N, Wakisaka S, Takeno M, Kaneko A, Asai T, Sakane T 2000. Involvement of cAMP responsive element binding protein (CREB) in the synovial cell hyperfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 18(1):47-55.
- Vassalli P 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10:411-452.
- Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, Lark MW 1992. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum*, 35(1):35-42.
- Wang J, Li C, Liu Y, Mei W, Yu S, Liu C, Zhang L, Cao X, Kimberly RP, Grizzle W, Zhang HG 2006. JAB1 determines the response of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to tumor necrosis factoralpha. *Am J Pathol*, 169(3):889-902.
- Westra J, Limburg PC, De Boer P, Van Rijswijk MH 2004. Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*, 63(11):1453-1459.
- Wilson RJ, Rhodes SA, Wood RL, Shield VJ, Noel LS, Gray DW, Giles H 2004. Functional pharmacology of human prostanoid EP2 and EP4 receptors. *Eur J Pharmacol*, 501(1-3):49-58.
- Woolley DE, Crossley MJ, Evanson JM 1977. Collagenase at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum*, 20(6):1231-1239.
- Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA 1998. Prostaglandin E₂ and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol*, 161(6):2723-2730.
- Yamamoto S, Sugahara S, Ikeda K, Shimizu Y 2007. Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by a novel phosphodiesterase 7 and 4 dual inhibitor, YM-393059. *Eur J Pharmacol*, 559(2-3):219-226.
- Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S, Nakagawa K, Nakashima Y, Irida T, Iwamoto Y, Nagai Y, Hasegawa M, Sueishi K 2002. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immunol*, 168(1):450-457.
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 59(6):455-461.
- Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Kinne RW 2001. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture - primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res*, 3(1):72-76.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W 2000. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol*, 164(5):2832-2838.

IV Anhang

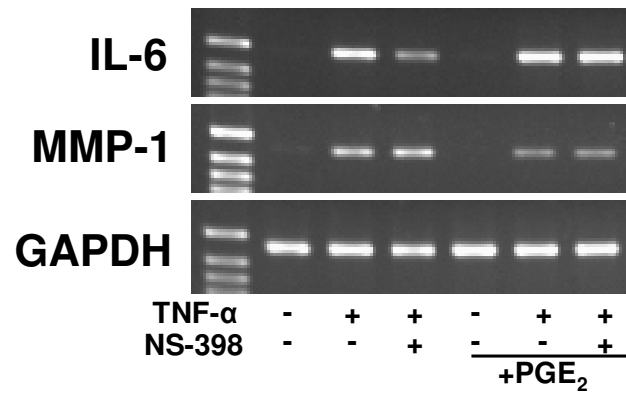


Abbildung 16: Modulierender Einfluss von PGE₂ auf TNF-α-induzierte mRNA-Expression von IL-6 bzw. MMP-1, original PCR-Gele

RA-SFB (n=4) wurden für 24 h mit TNF-α mit/ohne NS-398-Präinkubation bzw. PGE₂ stimuliert. Die mRNA-Expression von IL-6 und MMP-1 wurde mit konventioneller PCR bestimmt. Gezeigt sind PCR-Gele eines repräsentativen Patienten. Vgl. mit 5.1 bzw. 5.2/Abb. 6A, B.

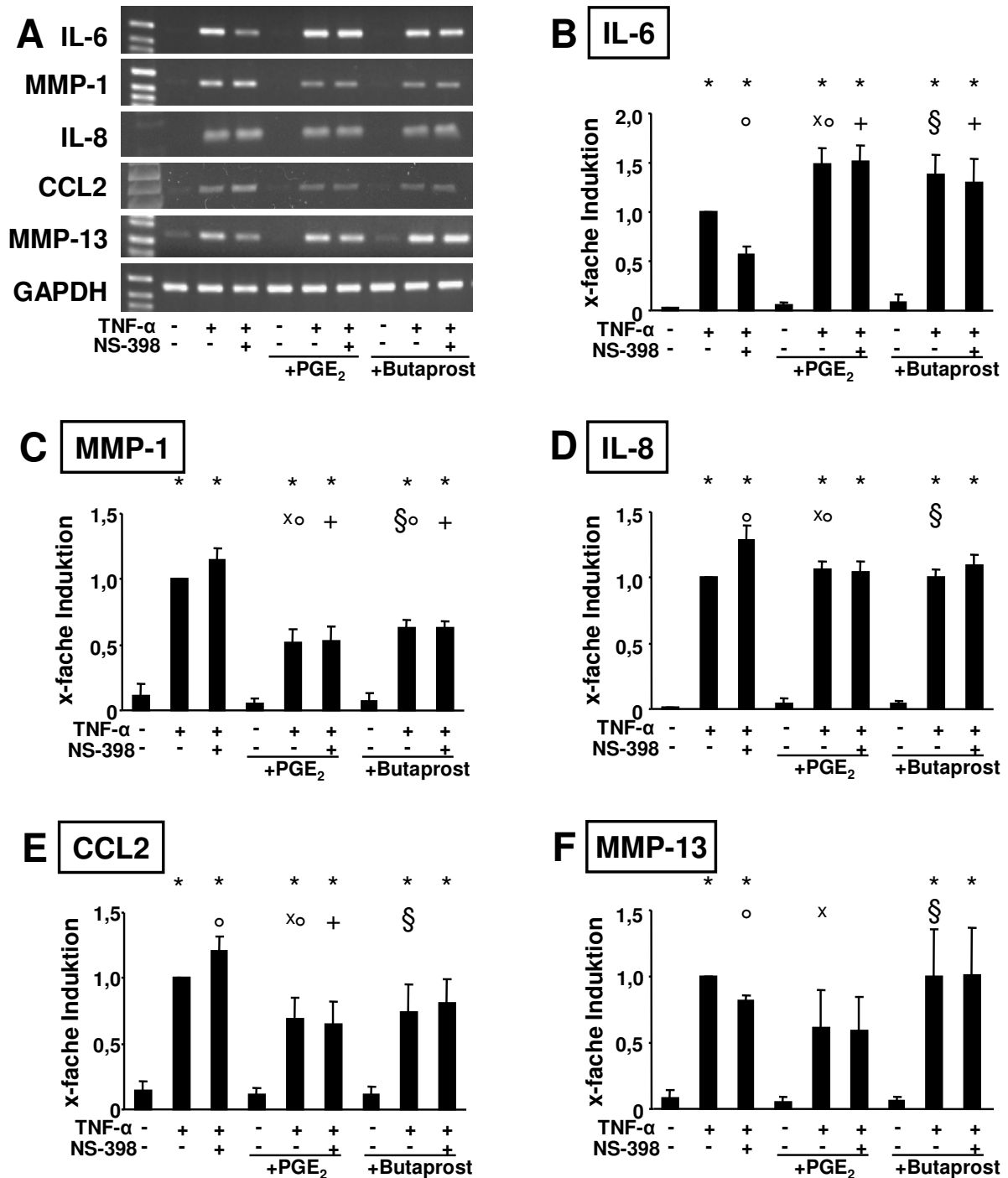


Abbildung 17: Modulierender Einfluss von PGE₂ und dem EP2-Agonisten Butaprost auf die TNF-α-induzierte mRNA-Expression von IL-6 und MMP-13 versus MMP-1, IL-8 und CCL2, vollständiger Datensatz

RA-SFB wurden für 24 h mit TNF-α mit/ohne NS-398-Präinkubation und mit PGE₂ oder Butaprost (1 μM) stimuliert. Gezeigt sind PCR-Gele eines repräsentativen Patienten (A). Aufgetragen ist der Mittelwert mit Standardfehler (B-F). Vgl. 5.6, Abb. 10.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

° Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF-α

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu TNF-α/ NS-398

x Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vgl. zur resp. Kontrolle alleiniger PGE₂-Stimulation

§ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur respektiven Kontrolle alleiniger Butaprost-Stimulation

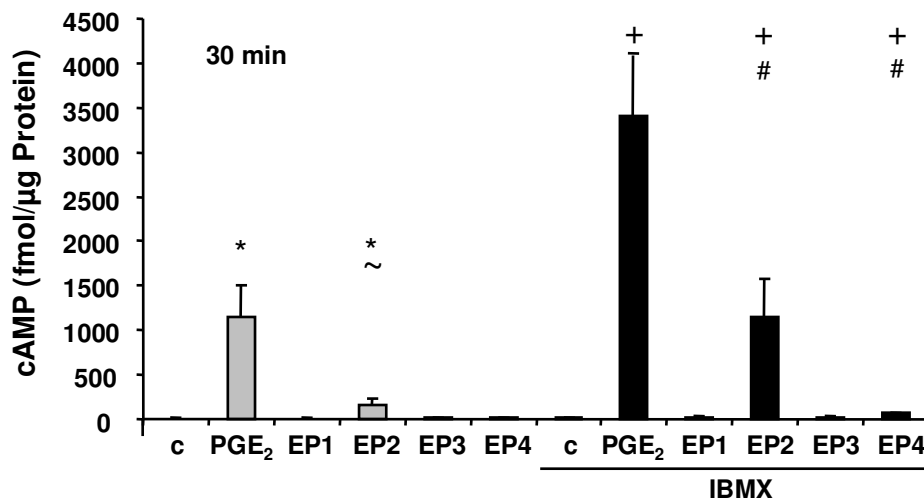


Abbildung 18: Selektive EP-Agonisten stimulieren die cAMP-Bildung, vollständiger Datensatz

RA-SFB (n=5) wurden für 30 min mit IBMX präinkubiert und dann für 30 min mit PGE₂ oder jeweils einem EP-Rezeptor-Agonisten stimuliert. Die cAMP-Konzentration wurde mittels eines kompetitiven EIA Kits bestimmt. Angegeben ist die cAMP-Konzentration in fmol/μg Protein. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler. Vgl. 5.7, Abb. 11.

* Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle

~ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu PGE₂

+ Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle mit IBMX

Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu PGE₂ mit IBMX

Tab. 12: Mittels Pathway Studio[®] gefundene Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren	
IL-6 – MMP-13	ATF3, CEBPA, CEBPB, ESR1, ESR2, FOS, HMGB1, JUN, JUNB, JUND, NR3C1, PPARG, RELA, RUNX1 , SMAD2 , SMAD3, STAT1, STAT3, TP53
IL-8 – MMP-1 – CCL2	AHR, CEBPA, CEBPB, ESR1, FOS, JUN, NFKB1, NR4A2, PPARG, PPARG, RELA, SP1, STAT3
IL-6 – MMP-13 -IL-8 – MMP-1 – CCL2	CEBPA, CEBPB, ESR1, FOS, JUN, PPARG, RELA, STAT3

Die aufgelisteten TF sind an der Regulation der entsprechenden Gene (linke Spalte) beteiligt. Die aufgelisteten TF können gleichzeitig auch an der Regulation einzelner oder mehrerer Gene aus der anderen Gruppe beteiligt sein. Ausschließlich an der Regulation von IL-6 und MMP-13 beteiligte TF sind fett markiert. Es wurden keine TF gefunden, die ausschließlich an der Regulation von IL-8, MMP-1 und CCL2 beteiligt sind. Vg. Abb. 14, Venn-Diagramm.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. R. W. Kinne für die Überlassung des Themas, anregende Diskussionen und die hervorragende Betreuung. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. E. Kunisch für die ausgezeichnete Anleitung und Einarbeitung in das Thema bedanken.

Für die finanzielle Förderung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanke ich mich bei dem Förderverein des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität und bei der Jenapharm AG für das Loder-Stipendium. Außerdem bedanke ich mich bei der Boehringer Ingelheim Foundation für das Reisestipendium, das meinen Forschungsaufenthalt in Lexington, Kentucky (USA) ermöglicht hat.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. L. J. Crofford bedanken für die Möglichkeit, vier Monate in ihrem Team in Lexington, Kentucky, mitarbeiten zu dürfen und die hervorragende Betreuung und herzliche Aufnahme in das Team während dieser Zeit. Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. F. Kojima für die umfassende Anleitung, die unschätzbaren Hilfen und vielen guten praktischen Tipps während meiner Zeit im Labor an der University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Rheumatologie und der Arbeitsgruppe von Frau Prof. L. J. Crofford an der University of Kentucky für die unschätzbare Hilfe sowie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei Herrn Dr. R. Huber möchte ich mich für seine hilfreichen Tipps bezüglich des erfolgreichen Verfassens von Dissertationen und die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei meinem Mann Lars Steffens, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, auf deren bedingungslose Unterstützung ich mich stets verlassen konnte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. R. W. Kinne, Dr. E. Kunisch, Dr. R. Huber, Prof. Dr. L.J. Crofford, Prof. Dr. F. Kojima, Frau B. Lanick und Frau B. Ukena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt,

Anne Steffens